

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

Elaine Simões Guerra Lopes

EFEITO DA ADRENALECTOMIA NA EVOLUÇÃO DA
DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL EM RATOS
WISTAR MACHOS INFECTADOS COM A CEPA Y DE
Trypanosoma cruzi.

Tese de Mestrado apresentada
ao Instituto de Biologia da
UNICAMP para obtenção do
título de Mestre em
Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

CAMPINAS
- 2004 -

Ficha bibliográfica

Campinas, 05 de fevereiro de 2004.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior

Profa. Dra. Urara Kawazoe

Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

Ao Wilson

Por todas as vezes que mesmo sem dominar muito bem o assunto, ficava me olhando, ouvindo, dando conselhos, sugestões, até mesmo críticas, colaborando assim, para a realização deste trabalho.....

Por todas as vezes que tivemos que deixar de lado algo que faz de nossas vidas momentos saudáveis e felizes.....

Pelo grande amor que nos une e que é à base de todas as minhas forças, te agradeço, pela compreensão, pela paciência, pela amizade e pelo incentivo dado a cada momento.

Foi a maior prova de amor que eu poderia ter na vida!

Te amo muito!

Aos meus pais

A quem devo toda minha gratidão e que desde minha infância, incentivaram-me a estudar sempre. Sou grata pelo amor, carinho e confiança a mim depositada. Obrigada, por serem exemplos de dignidade e fortaleza, sempre me mostrando a ver os fatos e a vida como realmente são, e nunca me deixando desistir.

Amo Vocês!

A DEUS,

“... Que , em sua infinita bondade, e pela força que age sobre nós, podendo fazer muito mais do que pedimos ou imaginamos, agradeço por ter me dado coragem de conquistar meus objetivos e de me acalantar nos momentos de fraqueza.

A ti ofereço minha vida...”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior, pela oportunidade e confiança à mim depositada, tornando a realização deste trabalho possível, sendo fundamental para essa conquista; a minha mais profunda gratidão... Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, agradeço pela confiança, pela constante colaboração durante as fases de minha tese, ajudando-me em muitos momentos difíceis. Obrigada pela amizade e incentivo

A Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão, professora da disciplina de Parasitologia, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, por se mostrar pronta a ajudar em todos os momentos, auxiliando e colaborando para que este projeto se realizasse.

Ao Prof. Dr. Jerri do Carmo Caldeira, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, pela colaboração na elaboração deste trabalho e pelo incentivo que me foi oferecido.

Aos técnicos da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Toninha e Georgius pela ajuda que foi oferecida.

A técnica da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, a amiga Míriam, agradeço pela disponibilidade com que me acolheu no laboratório, pela acessibilidade e competência com que me ensinou tudo que hoje sei. Pela paciência e pelas conversas que muito contribuíram, para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, que sem exceção, agradeço a todos, pelo carinho com que me receberam em suas vidas e pelo tempo que passamos juntos, durante conversas metodológicas, parasitológicas ou até conversas nem um pouco científicas, mas que me ajudaram a ser quem eu sou. Obrigada!

Aos docentes e funcionários do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, obrigada pelo, incentivo, pelo apoio, pela acolhida e amizade, proporcionando uma relação prazerosa e agradável.

Às Secretárias do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Margareth, Andréa e Rose agradeço pelo apoio e colaboração que me foi prestado.

Aos Colegas do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, principalmente a Angela Justus, pelas conversas, pela amizade e pela acolhida.

A Edna Aparecida dos Santos Moraes e Gilberto André e Silva do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, que muito contribuíram para a execução das lâminas histológicas do trabalho, e principalmente, pela grande amizade que nos uniu.

A Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli e ao doutorando Anderson Nunes de Sá, pelas dicas e sugestões oferecidas durante a realização deste trabalho.

A amiga Janaína Fernanda Gonçalves Neto, pela grande ajuda na execução desta pesquisa e pela grande amizade.

As amigas Karina Pontin, Valdelice de O. Burgos, Carla dos Santos Domingues, Leony Cristina Caetano, Colete Fonseca, Ana Lúcia Osakabe e aos amigos Eduardo e Fransérgio pelo incentivo e auxílio sempre que me foram necessários.

A Corinna Karin Dost, pelas dicas e discussões que muito contribuíram para a fase final deste trabalho.

Aos animais utilizados no experimento, cuja colaboração involuntária foi essencial.

A CAPES, pela concessão da bolsa, que possibilitou a realização deste trabalho.

A FAPESP, pelo auxílio financeiro oferecido, para a realização e execução deste trabalho de Mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
1 RESUMO	xvi
2 ABSTRACT	xvii
3 INTRODUÇÃO	01
3.1 Considerações gerais	01
3.2 Fisiologia do Sistema Endócrino	08
3.3 Sistema Imunológico do hospedeiro	13
4. CAPÍTULO I – O perfil do hemograma na doença de Chagas experimental em ratos <i>Wistar</i> adrenalectomizados ou não infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
4.1 Resumo	17
4.2 Introdução	19
4.3 Material e Métodos	22
4.3.1 Animais utilizados	22
4.3.2 Grupos experimentais	22
4.3.3 Dias de experimento	23
4.3.4 Parasitas	23
4.3.5 Adrenalectomia	24
4.3.6 Adrenalectomia fictícia (Sham)	24
4.3.7 Infecção ou simulação	25
4.3.8 Reposição de dexametasona	25
4.3.9 Eutanásia	26
4.3.10 Parasitemia	26
4.3.11 Coleta de sangue para exame hematológico	26
4.3.12 Microhematócrito	26
4.3.13 Contagem de eritrócitos e leucócitos	27
4.3.14 Contagem de plaquetas	27
4.3.15 Contagem de macrófagos	28
4.3.16 Dosagem de hemoglobina	28

4.3.17 Método estatístico	28
4.4 Resultados e Discussão	29
4.4.1 Parasitemia	29
4.4.2 Hemograma	33
5. CAPÍTULO II – A regulação do óxido nítrico em ratos <i>Wistar</i> machos adrenalectomizados infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
5.1 Resumo	41
5.2 Introdução	42
5.3 Material e Métodos	46
5.3.1 Animais utilizados	46
5.3.2 Grupos experimentais	46
5.3.3 Dias de experimento	47
5.3.4 Parasitas	47
5.3.5 Adrenalectomia	48
5.3.6 Adrenalectomia fistícia (Sham)	48
5.3.7 Infecção ou simulação	48
5.3.8 Reposição de dexametasona	49
5.3.9 Eutanásia	49
5.3.10 Quantificação do NO em macrófagos	50
5.3.11 Método estatístico	51
5.4 Resultados e Discussão	52
5.4.1 Análise da dosagem de NO – células do peritônio	52
5.4.2 Análise da dosagem de NO – células do baço	55
6. CAPÍTULO III – A influência da adrenalectomia em órgãos de ratos <i>Wistar</i> machos infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	61
6.1 Resumo	61
6.2 Introdução	62
6.3 Material e Métodos	67
6.3.1 Animais utilizados	67

6.3.2 Grupos experimentais	67
6.3.3 Dias de experimento	68
6.3.4 Parasitas	68
6.3.5 Adrenalectomia	69
6.3.6 Adrenalectomia fistícia (Sham)	69
6.3.7 Infecção ou simulação	69
6.3.8 Reposição de dexametasona	70
6.3.9 Eutanásia	70
6.3.10 Exame histopatológico	71
6.3.11 Intensidade do parasitismo tecidual	71
6.3.12 Técnica morfométrica (cariometria)	72
6.3.13 Métodos estatísticos	72
6.4 Resultados e Discussão	74
6.4.1 Parasitemia	74
6.4.2 Parasitismo tecidual	76
6.4.2.1 Coração	76
6.4.2.2 Fígado	77
6.4.2.3 Baço	78
6.4.2.4 Timo	79
6.4.3 Análise cariométrica	82
6.4.3.1 Coração	82
6.4.3.2 Baço	88
6.4.3.3 Fígado	94
6.4.3.4 Timo – região cortical	100
6.4.3.5 Timo – região medular	106
6.4.4 Histopatologia	112
6.4.4.1 Análise histopatológica do coração	112
6.4.4.1.1 Grupo controle sem infecção e infectado	112
6.4.4.1.2 Grupo Sham sem infecção e infectado	114
6.4.4.1.3 Grupo ADX sem infecção e infectado	116
6.4.4.1.4 Grupo A+D sem infecção e infectado	118

6.4.4.2	Análise histopatológica do baço	120
6.4.4.2.1	Grupo controle sem infecção e infectado	120
6.4.4.2.2	Grupo Sham sem infecção e infectado	122
6.4.4.2.3	Grupo ADX sem infecção e infectado	124
6.4.4.2.4	Grupo A+D sem infecção e infectado	126
6.4.4.3	Análise histopatológica do fígado	128
6.4.4.3.1	Grupo controle sem infecção e infectado	128
6.4.4.3.2	Grupo Sham sem infecção e infectado	130
6.4.4.3.3	Grupo ADX sem infecção e infectado	132
6.4.4.3.4	Grupo A+D sem infecção e infectado	134
6.4.4.4	Análise histopatológica do timo	136
6.4.4.4.1	Grupo controle sem infecção e infectado	136
6.4.4.4.2	Grupo Sham sem infecção e infectado	138
6.4.4.4.3	Grupo ADX sem infecção e infectado	140
6.4.4.4.4	Grupo A+D sem infecção e infectado	142
7	CONCLUSÕES GERAIS	147
8	BIBLIOGRAFIA	149

LISTA DE ABREVEATURAS

ACTH – hormônio adrenocorticotrópico

ADX – animais adrenalectomizados

A+D - animais adrenalectomizados com reposição de dexametasona

AVP – arginina vasopressina

BH4 – tetrahydro-L-biopterina

C – controle

Células T CD4 – Linfócitos T auxiliares

Células T CD8 – Linfócitos T citotóxicos

CRH – hormônio liberador de corticotropina

CT – corticosterona

DHEA – hormônio dehidroepindosterona

GC – glicocorticóide

GSH – glutatina

HHA – eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

Ig – imunoglobulina

IL – interleucinas

INF- γ - interferon-gama

ip - intraperitonal

LPS – lipopolissacarídeos

NA – noradrenalina

NK - células *natural killer*

NPV – núcleo paraventricular do hipotálamo

NO – óxido nítrico

NO₂ – nitrito

NO₃ – nitrato

NOSi – enzima óxido nítrico sintase induzida

PBS – solução salina tamponada

PCR – Polymerase chain reaction

RPMI – Roswell Park Memorial Institutes

SE – Sistema Endócrino

SI – Sistema Imunológico

Sham – operação fictícia ou simulada

SN – Sistema Nervoso

TBE – tribromoetanol

TGF- β - Transforming growth factor – beta

Th1 – Células T helper 1

Th2 - Células T helper 2

TNF- α - Fator de necrose tumoral - alpha

1. RESUMO

Os glicocorticóides são agentes terapêuticos, amplamente utilizados na terapia imunossupressora em doenças auto-imunes. O presente trabalho tenta avaliar as interações entre os glicocorticóides das glândulas adrenais e seus efeitos sobre a evolução da patogenia experimental chagásica em ratos *Wistar* machos, inoculados intraperitonealmente (i.p.), com 1×10^5 tripomastigotas sangüícolas, da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, e dividido em grupos: Controle sem infecção (CNI) e infectado (CI); Sham sem infecção (SHNI) e infectado (SHI); animais adrenalectomizados sem infecção (ADXNI) e infectado (ADXI); e animais adrenalectomizados com reposição de dexametasona sem infecção (A+DNI) e infectado (A+DI). Os parâmetros utilizados para esta avaliação foram: adrenalectomia, parasitemia, hemograma, dosagem de óxido nítrico e histopatologia do coração, baço, fígado e timo. O pico de parasitemia ocorreu no 9º dia após o inóculo, o que condiz com a literatura. O hemograma não apresentou alterações relevantes tanto para a série eritrocitária como para a série leucocitária, mostrando apenas uma ligeira tendência nos A+D, uma policitemia. Sabe-se da importância da produção de óxido nítrico (NO), para o controle da infecção sobre diversos parasitas intracelulares. A análise dos dados revelou que a adrenalectomia não alterou de forma significativa a produção de NO, mesmo no grupo A+D. Este último foi o que apresentou os menores níveis parasitêmicos e a mais alta produção de NO. As alterações histopatológicas durante o decurso da doença de Chagas não foram expressivas. A avaliação das modificações morfológicas do baço, fígado, coração e timo, permitiu a visualização de parasitismo tecidual somente no coração. A análise cariométrica mostrou alterações significativas entre os grupos, principalmente nos animais A+D, que apresentaram núcleos hipertrofiados. De uma maneira geral, podemos inferir que a resposta imune não foi prejudicada em função da adrenalectomia ou reposição de dexametasona.

2. ABSTRACT

Glucocorticoids are therapeutic agents widely used for auto-immune diseases. The number of papers concerning to the actions of glucocorticoids are still not well estabilished. The aim of this work is to evaluate the interactions between adrenal glucocorticoids and its effects on the development of experimental chagasic infection in male *Wistar* rats infected with 1×10^5 blood stage tripomastigotes of *Trypanosoma cruzi* Y strain. Experiments were prformed in groups of animals as follow: Infected and non-infected control (IC and NIC), Infected and non-infected sham operated animals (ISH and NISH), Infected and non-infected adrenalectomized (IADX and NIADX) and Infected and non-infected adrenalectomized with dexametasone reposition (IA+D and NIA+D). The parameters used for assessment were: adrenalectomy, parasitemia, hemogram, NO quantification and histopathological obdervations of heart, thymus, spleen and liver. The peak of parasitemia occured on the 9th. day after infection. The hemogram did not show significant alterations for both erythrocytic and leucocitary series. A slight tendency in displaying policitemia was found in adrenalectomized with dexametasone repositions groups. Nitric Oxide was a major factor in controlling intracellular pathogens. The results revealed that adrenalectomy did not change significantly alter NO production, even in adrenalectomized animals with dexametasone reposition. The latter group showed the most significant low level of parasitemia as well as the highest level of NO production. Histopathological observations did not show any important alterations. Amastigote burdens were found only among heart fibers. The cariometric evaluation showed some alterations, mainly in adrenalectomized group with dexametosone reposition where hypertrofic and more eliptoid nucleus were observed. The adrenalectomy or dexametasone reposition did not change the immune response to *T.cruzi*. The resistant Wister rat strain used in this work contributed to attenuate the level of parasitemia.

3 - INTRODUÇÃO

3.1 Considerações gerais

A doença de Chagas é uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Após 94 anos decorrentes da descoberta dessa doença pelo médico sanitarista Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1909), a ciência ainda tem se empenhado em tentar controlar e entender melhor esta endemia que afeta quase toda a América Latina, sendo apontada como uma das principais causas de morbidade entre as populações carentes da América do Sul, o que acarreta graves conseqüências sociais, elevando os custos previdenciários (LOPES et al, 1994), onde mais de 18 milhões de pessoas já foram infectadas (WHO, 2000).

Há evidências que emigrantes nos Estados Unidos, também possam ser pacientes soropositivos para *T.cruzi* (THEIS et al, 1987). Também foram encontrados triatomíneos na Ásia, África e Oceania, mas até 1991, nenhum caso de infecção humana por *Trypanosoma cruzi* havia sido relatado fora do Continente Americano (PEREIRA BARRETO, 1979, RASSI et al, 1991).

Esta doença é um exemplo típico resultante das alterações do ambiente produzidas pelo homem, das distorções econômicas e diferenças sociais. *Trypanosoma cruzi*, pertence ao subreino *Protozoa*, filo *Sarcomastigophora*, classe *Zoomastigophora*, ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Trypanosoma*, inserido na seção *Stercoraria* (HOARE, 1972; LEVINE, et al., 1980).

Possui um ciclo de vida complexo, circulando tanto em mamíferos de ambientes silvestres, como também domiciliares e peridomiciliares, sendo transmitido naturalmente por um vetor da família Reduviidae (HOARE, 1972).

Historicamente, o homem passou a fazer parte do ciclo de transmissão quando invadiu o ecótopo natural compreendido pelos vetores e seus hospedeiros mamíferos. Dessa maneira, os vetores passaram a invadir as habitações humanas, colonizando-se nos mais variados locais como buracos ou fendas em paredes, atrás de quadros ou pintura solta. Nota-se maior incidência em casas de condições precárias como as de pau-a-pique, sapé, madeira ou barro, sendo mais freqüentes em zonas rurais e entre a população de baixa renda (KIRCHHOF, 1995; NEVES, et al., 2000).

Classicamente, considerada como típica de áreas rurais, a incidência da doença vem aumentando devido ao êxodo rural. Nos centros urbanos, as pessoas tomam conhecimento da doença, quando realizam exames de triagem para a admissão de um novo emprego, serviço militar, exames clínicos de rotina ou outras situações.

Mesmo sendo a transmissão vetorial, a forma clássica de infecção do hospedeiro vertebrado, outras maneiras de contaminação podem estar envolvidas. A transmissão de *T. cruzi* por transfusão sangüínea é considerada a segunda via mais freqüente, devido a migração rural/urbana dos anos 70 e 80, onde alterou o tradicional padrão epidemiológico da doença de Chagas, obrigando os bancos de sangue a utilizarem métodos de triagem mais eficientes (DIAZ, 1979; COURA, 1985; CIMO et al., 1993; MONCAYO, 1999; BRENER, et al., 2000).

A terceira via mais freqüente de transmissão natural da doença de Chagas, é a congênita, constituindo problemas de saúde pública em áreas endêmicas e não

endêmicas, devido à migração rural para os centros urbanos (SCHENONE, et al., 1987; ZAIDENBERG, et al., 1993; BRENER, et al., 2000).

As outras formas excepcionais de transmissão são: através da amamentação, acidentes em laboratórios, por transplantes de órgãos, oral e sexual (FERRAZ, et al., 1993; DIAS et al., 1997; BRENER et al., 2000).

T.cruzi apresenta quatro formas morfogênicas distintas em seu ciclo evolutivo: a forma epimastigota e tripomastigota metacíclica infectante, presentes no inseto vetor, e as formas amastigotas e tripomastigotas sangüícolas presente no hospedeiro vertebrado (BRENER et al., 1963; BRENER, 1965).

O homem como outros animais, se infecta quando o vetor natural contém formas tripomastigotas metacíclicas. Estas são eliminadas juntamente com as fezes do triatomíneo (hospedeiro invertebrado) sobre a pele do hospedeiro vertebrado, penetrando ativamente, ou pela lesão da picada ou por membranas mucosas (BRUMPT, 1912; CHAGAS, 1933), indo diretamente parasitar as células do sistema fagocitário mononuclear, principalmente os macrófagos.

Por sua vez, o triatomíneo se infecta ingerindo as formas tripomastigotas do sangue periférico do hospedeiro vertebrado durante o repasto sangüíneo. A transformação e todo o desenvolvimento do flagelado no vetor estão relacionados a espécie do triatomíneo e as diferentes cepas do parasita (GARCIA & DVORAK, 1982).

Devido ao comportamento dos parasitas, inúmeros pesquisadores procuram novos reservatórios naturalmente infectados, na tentativa de elucidar o papel que estes desempenham na epidemiologia da doença. Hoje, reconhecem-se pelo menos sete diferentes ordens de vertebrados sendo elas: Marsupialia, Edentata, Chiroptera,

Carnivora, Lagomorfa, Rodentia e Primata. Como vetores, a ordem Insecta contribui com mais de 50 espécies de hemípteros reduvídeos naturalmente infectados, sendo os mais importantes *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* (BARRETO, et al., 1964; PESSOA & MARTINS, 1990).

A doença causada por *Trypanosoma cruzi* é importante, pois apresenta sintomatologia e evolução variável, principalmente no homem, devido a influência de diversos fatores como: susceptibilidade do hospedeiro, respostas imunológicas, idade, sexo, constituição genética, morfologia e linhagem da cepa infectante, apresentando tropismo para diversos tecidos (BRENER, 1962 e 1969).

MELO & BRENER (1978) caracterizaram as cepas de *T. cruzi*, em largas por apresentarem tropismo para células musculares, através de receptores específicos na membrana celular, o que as torna mais adaptadas ao desenvolvimento no inseto vetor. No entanto, as formas delgadas como a cepa Y, caracterizam-se por multiplicação rápida, picos parasitêmicos precoces, alta mortalidade em camundongos, tropismo tecidual diferenciado para as células do sistema fagocitário mononuclear, esplenócitos, hepatócitos e medula óssea (ANDRADE, 1976), causando lesões tissulares graves.

De acordo com as técnicas bioquímicas e métodos de biologia molecular, muitos pesquisadores estão caracterizando as diferentes cepas de *T. cruzi*. Os vários dados obtidos foram apresentados durante o International Symposium on the Advances of Knowledge of Chagas Disease 90 Years After its Discovery (Satellite Meeting, 1999), onde se decidiu normalizar a nomenclatura de dois grupos de *T. cruzi* :

***T.cruzi* I** - Zimodema 1 (MILES et al., 1980); Linhagem 2 (SOUTO et al., 1996); Tipo III (ANDRADE, 1974); Ribodema II/III (CLARK et al., 1994).

***T.cruzi* II** – Zimodema 2 (MILES et al., 1980); Linhagem 1 (SOUTO et al., 1996); Tipo II (ANDRADE, 1974); Ribodema I (CLARK et al., 1994). A cepa Y de *T.cruzi* pertence a este grupo.

O curso da doença de Chagas no homem pode apresentar as fases: aguda, indeterminada e crônica.

A fase aguda caracteriza-se normalmente por apresentar parasitemias patentes, sendo um importante parâmetro para o estudo desta doença, e pela relativa facilidade com que se evidencia o parasita tanto no sangue periférico, através de métodos diretos (OLIVEIRA FERREIRA, 1968), como por métodos sorológicos através da presença de IgM. As manifestações clínicas na fase aguda quando presentes, aparecem sob a forma do sinal de Romanã (inoculação ocular) ou chagoma de inoculação (inoculação cutânea). Na fase crônica as alterações sistêmicas podem advir sob a forma de hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, linfocitose e alterações eletrocardiográficas (RASSI, 1979).

A parasitemia sangüínea é um importante parâmetro para o estudo da doença de Chagas, pois permite a diferenciação entre as fases aguda e crônica da infecção, necessária para o estabelecimento da correlação anátomo-patológica e monitoramento do processo de cura dos pacientes (SOGAYAR et al., 1993).

Outro parâmetro de diagnóstico utilizado para o acompanhamento da evolução de uma doença é o hemograma, que constitui o meio mais direto e prático para se estudar os elementos figurados do sangue periférico. Sabe-se, que o quadro hematológico da Doença de Chagas em humanos é do tipo linfomonocitário apresentando algumas vezes discreta anemia ferropriva (RASSI, 1979). Já estão bem estabelecidos os parâmetros hematológicos normais de vários animais experimentais como camundongos (ARCHER et al., 1977), roedores silvestres (PRADO JR et al., 1999) e ratos (ARCHER et al., 1977).

Ao término da fase aguda, pode advir um intervalo assintomático de duração variável, conhecido como fase indeterminada ou inaparente da fase crônica (BRENER & COLS, 2000). Nesta fase de latência, o indivíduo mesmo não apresentando qualquer manifestação típica da forma crônica da doença, como ausência de sintomas/sinais, eletrocardiograma normal e radiologia normal de diversos órgãos, alberga o parasita, que pode ser apenas evidenciado por testes sorológicos ou xenodiagnóstico, (BARRETO et al., 1994). A forma indeterminada corresponde ao período entre a primeira infecção e o início das manifestações clínicas, da fase crônica, com duração variável entre 10 a 30 anos, podendo permanecer nesta forma por toda vida (AMATO NETO, 1986).

Na fase crônica as parasitemias são baixas ou ausentes, sendo a infecção evidenciada apenas por testes sorológicos (detectando a presença de IgG), hemocultura, xenodiagnóstico ou por testes de biologia molecular como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Durante esta fase, as formas clínicas mais importantes são as cardiopatias e as manifestações gastrintestinais (PESSOA et al., 1977), sendo

estas patologias normalmente decorrentes mais das respostas autoimunes, do que a própria presença do parasita. No tecido do hospedeiro, antígenos parasitários são liberados, como também, antígenos da própria célula hospedeira. Este último, erroneamente, não é reconhecido pelo sistema imune celular, provocando uma sensibilização prévia a esse antígeno. No decorrer da fase aguda da infecção esses antígenos autólogos são responsáveis por desencadear uma resposta autoimune do hospedeiro, causando assim, graves lesões tissulares (COSSIO et al, 1976).

A doença de Chagas pode ser avaliada experimentalmente mediante o acompanhamento de sua evolução em diferentes modelos experimentais como ratos (WING et al., 1993), camundongos (RIBEIRO et al., 1982) e roedores silvestres (BRENER & CHIARI, 1963; ANDRADE et al., 1970; BORGES et al., 1982; BORGES et al., 1992a e BORGES et al., 1992b; CARDILLO et al., 1996; PRADO JR et al., 1998 e 1999; BRENER et al., 2000; DOST et al., 2002), podendo-se reproduzir nos mesmos, os distintos aspectos patológicos da doença humana.

Ratos *Wistar* foram também muito utilizados como modelo experimental na infecção chagásica, já que na natureza os ratos possuem uma participação muito importante como disseminadores da tripanosomíase americana. Segundo BRENER et al. (2000), ratos e cobaias silvestres foram encontrados naturalmente infectados por *T.cruzi*, com índices que variam de 10 a 40%, extremamente dispersos ao longo de todo o Continente Americano.

Para ratos, infectados com a cepa Y de *T.cruzi*, o padrão da curva parasitêmica se mantém com picos compreendidos entre o 9º e 12º dias, onde então, os parasitas desaparecerão da circulação iniciando-se a fase crônica (ANDRADE et al.,

1970 e ANDRADE, 1974). Na utilização de ratos jovens, o pico de parasitemia pode ocorrer no 7º dia (UYEMURA et al., 1995).

A utilização de roedores em pesquisa contribuiu para ajudar a detalhar a descrição celular, molecular e fenomenológica para o sistema imune de mamíferos. O estudo histopatológico sistemático realizado em roedores infectados por *T.cruzi* demonstrou incidência de lesões crônicas, inflamatórias e degenerativas no músculo cardíaco, semelhante às causadas na doença humana (BRENER et al., 2000).

Nas infecções laboratoriais provocadas por *T.cruzi*, foi demonstrado que as fêmeas são menos susceptíveis que os machos, devido entre outros fatores, a influência hormonal especialmente exercida pelo estrógeno, que estimula os macrófagos a realizarem fagocitose, aumentando a produção de Óxido Nítrico (NO) (GROSSMANN, 1985 e EIDINGER & GARRET, 1972). O estrógeno, através da supressão das células "*T supressor*", aumenta a resposta imune humoral. Esta diferente resposta imunológica frente a estímulos, é encontrada em várias espécies de mamíferos, incluindo o homem.

3.2 Fisiologia do Sistema Endócrino

A literatura mostra a existência de várias evidências da comunicação bidirecional entre os sistemas imune e neuroendócrino (MASTORAKOS e cols., 1999). Na década de 40, iniciaram-se os estudos sobre a participação dos andrógenos e estrógenos na evolução do timo e suas relações com os demais órgãos linfóides.

O Sistema Endócrino (SE) possui mecanismos de respostas semelhantes a do Sistema Nervoso (SN), que interagem a todo tempo, respondendo a diferentes

informações ou estímulos “eferentes”, com o objetivo de atingir um equilíbrio homeostático, em resposta a fatores estressantes.

Para que haja a comunicação entre estes dois sistemas, existem moléculas sinalizadoras, tendo a função de mediadores químicos das respostas, onde se ligam a uma célula-alvo, estimulando-a ou inibindo-a. Os mediadores químicos do sistema nervoso são conhecidos como neurotransmissores e do sistema endócrino como hormônios.

Os Sistemas Nervoso e Endócrino estão interrelacionados através do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), que também influencia o Sistema Imune (SI).

Desde o século XIX, há trabalhos que evidenciam a importância e a função das glândulas adrenais. O significado fisiológico destas glândulas começou a ser avaliado em consequência da descrição de Addison (1885) da síndrome clínica que resultava da doença destrutiva das glândulas adrenais. Estas observações foram desenvolvidas por BROWN-SÉQUARD (1856), que empreendeu experiências pioneiras sobre os efeitos da adrenalectomia e concluiu que estas glândulas são essenciais para a vida (GOODMAN & GILMAN, 1983).

As glândulas adrenais ou supra-renais estão localizadas no pólo superior dos rins, e embriológica e funcionalmente se dividem em duas partes distintas: uma externa chamada de *córtex adrenal* e outra interna denominada de *medula adrenal*.

Na camada medular são produzidas as catecolaminas: adrenalina e noradrenalina.

A parte do córtex da glândula adrenal é subdividida em 3 zonas: a mais externa, *zona glomerulosa*, responsável pela secreção dos hormônios

mineralocorticóides e aldosterona, que são importantes para o equilíbrio hidromineral (principalmente Na^+ e K^+); a *zona intermediária ou fasciculada*, cujos hormônios são os glicocorticóides (principalmente o cortisol no homem e corticosterona no rato) com efeitos no metabolismo de carboidratos e proteínas; e a *zona reticular* que secreta os hormônios esteróides sexuais (andrógenos), como por exemplo, o Dehidroepiandrosterona (DHEA), que é um imunomodulador e antagonista do cortisol.

O precursor dos hormônios sintetizados pelas células do córtex da adrenal é o colesterol sendo a maior fonte deste elemento o colesterol plasmático. Quando a produção dos adrenocorticais se encontra acelerada, passam a ser utilizados os depósitos intracelulares de colesterol (AIRES, 2000)

Já foi identificada a presença de receptores para glicocorticóides (GCs), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e hormônio liberador de corticotropina (CRH) em células do sistema imune. Da mesma forma, sítios específicos para citocinas, tais como IL-1, IL-2 e IL-6, também foram encontrados no eixo HHA (WEIGENT e BLALOCK, 1995).

A ativação deste eixo em resposta a um estímulo estressor, é iniciada na parte central do SN, estimulando o hipotálamo a secretar o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (VALE et al., 1981), que por sua vez, atua em nível da adeno-hipófise, estimulando a secreção do ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) (RIVIER, et al., 1983). Este hormônio atua no córtex das glândulas adrenais, resultando na produção e liberação de glicocorticóides (GCs).

O hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a arginina vasopressina (AVP) são neuropeptídeos, produzidos por neurônios parvocelulares do núcleo

paraventricular (NPV) do hipotálamo. Ambos, neurohormônios são estimuladores da secreção de ACTH, que através da circulação sistêmica estimula a produção e secreção de GCs, cortisol (no homem) e CT (corticosterona no rato) (CALDEIRA & FRANCI, 2000). Os GCs (endógenos e exógenos) são efetores finais do eixo HHA, e exercem profundo efeito no processo imune inflamatório, afetando a produção e a circulação de leucócitos, causando linfopenia, monocitopenia, eosinopenia e neutrofilia (BESEDOVSKY et al, 1986). Além disso, inibem a produção de inúmeras citocinas, a expressão e adesão de receptores moleculares na superfície de células do sistema imune e outras células (HIRANO et al., 1990).

Existem poucas informações sobre a influência dos hormônios adrenocorticais na infecção chagásica, e estes trabalhos existentes apresentam resultados conflitantes.

Os glicocorticóides exercem uma importante ação imunossupressora, por diminuírem a expressão do RNAm, bem como o número de receptores nos seus respectivos tecidos alvo. Além disso, os GCs inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α , IFN- γ , enquanto estimulam a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4 (HIRANO et al., 1990).

Várias citocinas são capazes de estimular o eixo HHA *in vivo* e *in vitro* em diferentes sítios de ação (hipotálamo, hipófise, adrenal). A administração *in vivo* de IL-1 α ou IL-1 β aumenta a concentração periférica de ACTH e CT, bem como de CRH e AVP no sistema porta hipofisário (SAPOLSKY e cols., 1987).

Diante de um estímulo estressor, o CRH é o principal coordenador das respostas relacionadas ao estresse, levando a uma elevação plasmática de corticosteróides e noradrenalina (NA) central e periférica (CHROUSOS e GOLD, 1992).

Muitos estudos indicam que vários estímulos estressores podem influenciar a secreção de citocinas, como IL-1, IL-2 e TNF- γ (ZHOU e cols, 1993; LIAO e cols, 1995). CALDEIRA e FRANCI (2000) mostraram que lesões seletivas do NPV causam elevação da CT plasmática de ratos submetidos ao estresse agudo, sugerindo que nesta condição ocorra uma hipersensibilidade do eixo HHA. Contudo, lesões inespecíficas do NPV ou a retirada cirúrgica da adrenal (adrenalectomia), abolem a produção de CT. A reposição de CT por glicocorticóides sintéticos como a dexametasona, pode ser utilizada no intuito de se averiguar a ação deste hormônio, sobre os diferentes parâmetros causados por *T.cruzi*.

A maioria das patologias causadas por agentes infecciosos, causa no hospedeiro um estado de desequilíbrio homeostático, levando a uma imunossupressão devido ao estresse, permitindo ao agente etiológico evadir-se da resposta imune e estabelecer no novo ambiente, condições necessárias para sua perpetuação. Em humanos e roedores, a veia central da glândula adrenal é considerada o local preferencial de instalação do *T.cruzi* na fase crônica da doença de Chagas. Isto ocorre, devido a maior concentração de GCs que podem proteger o parasita contra as defesas do hospedeiro (CALIARI et al., 1994 e CUNHA et al., 1994).

O aumento da concentração plasmática de GCs durante os processos infecciosos é responsável pela involução do baço, do timo e aumento da taxa de mortalidade (REGELSON et al., 1994).

Quando esta fonte de produção hormonal é retirada, no caso da adrenalectomia, a reposição de corticosterona no rato pode ser feita utilizando-se glicocorticóides sintéticos como a dexametasona, que irá produzir uma série de respostas adaptativas, entre elas, elevadas concentrações de ACTH no sangue. Os glicocorticóides sintéticos foram desenvolvidos para o tratamento anti-rejeição de órgãos transplantados, bem como de doenças auto-imunes, tais como lúpus eritematoso, artrite reumatóide esclerose múltipla etc.

3.3 Sistema Imunológico do hospedeiro

Grande parte das manifestações clínicas da doença de Chagas deve-se a ativação das respostas imunes dirigidas ao parasita (ALIBERTI et al., 1996).

A mobilização do sistema imune é importante na redução da carga parasitária, mas por outro lado, pode contribuir para o aparecimento das manifestações clínicas crônicas devido às respostas autoimunes. Várias pesquisas têm sido feitas na tentativa de se compreender a relação que existe entre *T. cruzi* e seus hospedeiros, e como esta interação pode direcionar o curso da infecção.

A ativação de diferentes tipos de células do sistema imune e moléculas solúveis por elas produzidas desempenham participação direta no controle da carga parasitária durante a fase aguda da infecção (ALIBERTI et al, 1999). *T.cruzi* é capaz de induzir prontamente a ativação/produção de proteínas e enzimas efetoras da imunidade

inata natural. Porém, a forma tripomastigota consegue resistir ao ataque da via alternativa do complemento (C), permitindo uma infecção bem sucedida, nas células do hospedeiro.

O papel dos macrófagos, como primeira linha de defesa do organismo contra patógenos intracelulares, já está bem estabelecido (TALIAFERRO & PIZZI, 1955; MACKANESS, 1969). Os macrófagos e as células T desempenham uma função importante no controle da infecção chagásica (NATHAN et al., 1979). KIERSZENBAUM et al. (1976) demonstraram que o tratamento de macrófagos com sílica, substância capaz de bloquear a fagocitose, torna camundongos mais susceptíveis à infecção por *T.cruzi*, mesmo com a utilização de cepas avirulentas. Mesmo exercendo um importante papel na função efetora no controle da resposta imune do hospedeiro, os macrófagos representam provavelmente, uma das primeiras células envolvidas na infecção chagásica, sendo capazes de abrigar o parasita e permitir sua multiplicação.

BORGES et al (1992 a) descreveram que a ativação dos macrófagos peritoniais, avaliada pela capacidade destas células liberarem peróxido de hidrogênio (H_2O_2), varia de acordo com a espécie do animal experimental e com a cepa do parasita. A capacidade dos macrófagos participarem da destruição de certos parasitas envolve vários mecanismos complexos que dependem também da cepa do parasita (MILDER et al., 1977; ALCANTARA & BRENER, 1978), da forma evolutiva (MILDER et al., 1977; NOGUEIRA et al., 1980; KLOETZEL et al., 1984; UMEZAWA et al., 1985), além do estado de ativação dos macrófagos (NOGUEIRA et al., 1977).

O mais importante sinal para a ativação dos macrófagos é o IFN- γ , que tem sido considerado como uma importante citocina para a destruição de *T. cruzi* (PLATA et al., 1984; MURRAY et al., 1985). Outras substâncias como o TNF- α e fatores inespecíficos, como o LPS (lipopolissacarídeos), podem estar envolvidos no processo de ativação dos macrófagos (ALCINA & FRESNO, 1987). Isto ocorre porque *T. cruzi* inicia sua interação molecular em macrófagos, induzindo a produção de IL-12, que além de estimular a proliferação de linfócitos T, ativa as células NK (*natural killer*) a produzirem IFN- γ , cuja função é acionar os macrófagos para a atividade microbicida (ALIBERTI et al., 1996). Dessa forma TNF- α , produzido pelos macrófagos durante a infecção, interage de forma sinérgica tanto com IL-12 como com IFN- γ , ativando os macrófagos a expressarem a enzima óxido-nítrico (NO) sintase induzida e a produção de NO (MILLER, et al., 2002).

O controle da fase aguda da infecção está relacionado com a resposta celular, onde as células T exercem um efeito anti-parasita precoce e anterior à produção de anticorpos (TRISCHMANN, 1984).

A resposta das diferentes sub-populações de linfócios T nem sempre são benéficas para o hospedeiro. A resposta celular por Th1 frente a um estímulo infeccioso inibe o avanço da enfermidade, normalmente atingindo um equilíbrio entre o parasita e seu hospedeiro, produzindo IFN- γ típico desta resposta; o oposto acontece com o padrão Th2, (resposta imune humoral/anti-inflamatória) que permite a exacerbação da doença (SILVA et al., 1992).

As interleucinas têm um papel fundamental durante a infecção por *T. cruzi*. O IFN- γ é capaz de inibir *in vitro* o seu desenvolvimento (PLATA et al., 1984), e, *in vivo* é capaz de diminuir a parasitemia e prolongar a sobrevivência de animais infectados (PLATA et al., 1987).

Recentes evidências indicam que os GCs e as catecolaminas inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α e IFN- γ , e estimulam a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4 (MILLER et al., 2002, MERCADO et al., 2002) permitindo o escape do parasita e reduzindo os efeitos autoimunes e deletérios provocados pela resposta imune exacerbada no hospedeiro.

O propósito deste estudo é avaliar a influência da adrenalectomia, em animais com e sem reposição de dexametasona, durante a evolução da doença de Chagas experimental em ratos *Wistar* machos, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, tomando como parâmetros o controle da parasitemia, a análise do hemograma, dosagem dos níveis de Óxido Nítrico (NO) e a avaliação histopatológica do baço, timo, fígado e coração, juntamente com a cariometria.

4. Capítulo I

Perfil do hemograma na doença de Chagas experimental em ratos *Wistar Rattus rattus* adrenalectomizados ou não, infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

4.1 Resumo

Diante da problemática de encontrar meios mais eficazes de combater o protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, há muitos estudos sendo realizados em diversas áreas de pesquisa, inclusive na Fisiologia Endócrina.

No presente trabalho, foi realizada a avaliação do hemograma, juntamente com a parasitemia, em animais não infectados e infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, que tiveram suas glândulas adrenais removidas (adrenalectomia), com ou sem reposição de dexametasona, comparados com os grupos controle e sham.

Verificou-se que o pico parasitêmico se manteve no 9º dia após o inóculo para todos os grupos, ficando o grupo adrenalectomizado (ADX) com a maior parasitemia. Em contrapartida o grupo adrenalectomizado infectado com reposição de dexametasona (A+D), apresentou os menores níveis parasitemicos.

Os resultados obtidos mediante avaliação do hemograma não demonstraram diferenças nas células, tanto da série vermelha como da série branca. Estatisticamente não houve nível de significância ($p < 0.05$) para nenhuma das análises apresentas. Estes resultados sugerem que a falta dos hormônios produzidos pela glândula adrenal, a

reposição de um hormônio sintético e mais a infecção do parasita, não alterou a produção e a função das células vermelhas e brancas no organismo durante o período de 23 dias propostos pelo trabalho.

4.2 Introdução

Decorridos 95 anos da descoberta do agente etiológico, causador da Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, por Carlos Chagas (1909), esta parasitose ainda é considerada um problema de saúde pública na América Latina. A Organização Mundial de Saúde estima que existam 16 a 18 milhões de pessoas infectadas nas Américas, desde do norte do México até o sul da Argentina e Chile, dentro de uma população de risco de aproximadamente 90 milhões de pessoas (WHO,2000).

Diante de toda esta problemática, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de descobrir mais sobre o parasita e suas influências nos diferentes hospedeiros.

Sabe-se que a doença de Chagas pode ser avaliada experimentalmente através do acompanhamento de sua evolução em diferentes modelos experimentais (BORGES et al.,1982, BORGES et al., 1992a e BORGES et al., 1992b; PRADO JR. et al., 1998 e 1999).

Para a realização de um protocolo experimental, diversos fatores estão envolvidos, entre eles: idade, fatores genéticos, condições de estresse, estado nutricional e o dimorfismo sexual dos modelos experimentais, já que as fêmeas possuem uma capacidade imunológica humoral e celular superior em relação aos machos (GROSSMANN,1985).

Há evidências da comunicação bidirecional entre os sistemas imune e neuroendócrino, mediante o envolvimento dos hormônios e suas ações sobre o

organismo, através de estímulos, alterando ou não a homeostase corpórea, diante da presença de *Trypanosoma cruzi*.

Os hormônios das glândulas adrenais são importantes, pois exercem influências marcantes em todas as situações de estresse e imunodepressão. A corticosterona (CT) presente nos ratos, possui ação anti-inflamatória, ajudando o organismo do hospedeiro a minimizar a intensidade dos processos inflamatórios, sendo também amplamente utilizada como agente terapêutico no tratamento de doenças autoimunes. Além disso, os corticosteróides influenciam negativamente a magnitude da resposta imune, deprimindo a produção de inúmeras interleucinas e reduzindo a blastogênese de células T (WEIGENT e BLALOCK, 1995).

Quando é retirada a fonte de produção hormonal, através da adrenalectomia, ou quando há reposição de corticosterona no rato, com a utilização de glicocorticóides sintéticos, como a dexametasona, podemos produzir uma série de respostas adaptativas.

Um dos meios de avaliar as alterações ocorridas no organismo, não só para parâmetros de diagnóstico, mas também, como meio de acompanhamento do desenvolvimento de uma doença, é através do hemograma.

A quantificação da série eritrocítica, através de distintos parâmetros como, a dosagem de hemoglobina, a contagem de eritrócitos e a determinação do hematócrito, revelam-se bons indicadores da evolução de diversas doenças, inclusive a doença de Chagas, já que um dos quadros freqüentes durante o curso da infecção chagásica experimental é a anemia.

Apesar disto, torna-se muito difícil estabelecer quadros hematológicos específicos de doenças através das alterações numéricas dos glóbulos circulantes, pois estas alterações quase sempre são inespecíficas e comuns a um grande número de doenças.

A anemia também foi descrita, ao inocular *T.brucei* e *T.congolense* em camundongos, sendo a patogenia desta, explicada por diversos fatores, tais como aumento da destruição dos eritrócitos, injúria à medula óssea e hemodiluição (IKEDE, et al., 1977).

ANDREWS & WHITLOW (1989), descrevem a atividade de uma hemolisina secretada por *T.cruzi*, capaz de induzir a lise de eritrócitos de diversas espécies animais, inclusive no homem. Essa hemolisina só age em pH ácido e poderia estar envolvida na patogênese da fase crônica da doença de Chagas, onde pacientes apresentam severa miocardite, megaesôfago e megacólon.

Quanto à série leucocitária a doença de Chagas caracteriza-se por apresentar um perfil linfomonocitário característico (RASSI, 1979).

Sabe-se que os glicocorticóides tendem a aumentar a hemoglobina e a quantidade de hemácias do sangue, possuindo ação antagônica sobre os leucócitos circulantes.

Sendo assim, neste trabalho foram avaliados os parâmetros hematológicos de animais adrenalectomizados, com e sem reposição de dexametasona, comparado com animais dos grupos controle e sham, diante da infecção chagásica.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Animais utilizados

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar*, jovens, pesando entre 100 e 110 gr, provenientes de uma colônia mantida no biotério da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Esses animais foram ambientados no biotério da FCFRP-USP, sendo mantidos a uma temperatura ambiente de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, num ciclo claro/escuro 12/12 horas, com a água e ração da marca Nuvilab *ad libitum*. Estes animais são apropriados para o trabalho porque, além de terem um tamanho maior que camundongos, melhorando visualização da glândula adrenal, também conseguem sobreviver por um período maior de tempo mesmo infectado, atingindo até o 23º dia , proposto pelo trabalho.

4.3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos e identificados como:

Grupo Controle:

CNI - Animais não operados e não infectados (n = 5)

SHNI – Animais sham não infectados (n = 5)

ADXNI – Animais Adrenalectomizados não infectado (n = 5)

A+DNI – Animais Adrenalectomizados não infectado, com reposição de dexametasona (n = 5)

Grupo Infectado:

CI – Animais não operados e infectados com *T.cruzi* (n = 5)

SHI – Animais sham infectados com *T.cruzi* (n = 5)

ADXl – Animais Adrenalectomizados infectados com *T.cruzi* (n = 5)

A+DI – Animais Adrenalectomizados infectados com reposição de dexametasona (n = 5)

Foi utilizado um total de 20 animais por dia de experimento.

4.3.3 Dias de experimento

Os experimentos foram realizados em dias pré-determinados, após a infecção: na fase inicial da doença (5º.), no pico da parasitemia (9º.), na fase descendente (14º.) e no início da fase indeterminada (23º.). Estes dias foram escolhidos baseados na curva parasitêmica, onde o pico ocorre entre o 9º. e 12º., após o inóculo. Para cada dia de experimento, foram sacrificados 5 animais de cada grupo.

4.3.4 Parasitas

Utilizou-se a cepa Y de *T.cruzi*, isolada por SILVA & NUSSENZWEIG (1953), através de xenodiagnóstico realizado em uma paciente na fase aguda da infecção chagásica. Desde então, vem sendo mantida em camundongos *swiss* heterogênicos, por meio de repiques semanais no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

Trata-se de uma cepa com predominância de formas delgadas, multiplicação rápida e picos parasitêmicos precoces, determinando alta mortalidade em camundongos e tropismo tecidual preferencialmente para as células do sistema fagocitário mononuclear, parasitando com frequência esplenócitos, hepatócitos e medula óssea (ANDRADE, 1976), causando lesões tissulares graves.

4.3.5 Adrenalectomia

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de Tribromoetanol (TBE) a 2,5% (0,025g/ml), diluído em NaCl 0,15M, sendo injetado 1ml a cada 100g de peso corporal. A incisão foi feita na pele e tecido subcutâneo na linha média, tendo como referência o ângulo entre a última costela e a coluna vertebral. Após a visualização dos órgãos abdominais, foi pinçada a gordura peri-renal abaixo da adrenal, removendo estas glândulas. Após o ato cirúrgico, os animais foram colocados em caixas estéreis, com maravalha e ração, sendo imediatamente aplicada uma injeção de pentabiótico (0,1ml/kg), com o intuito de prevenir possíveis infecções bacterianas. Os animais receberam a água filtrada, ração e salina hipertônica 2% *ad libitum*, juntamente com antibiótico (Amoxilina), diluído em água no volume de 0,75g/ml para cada animal durante 5 dias.

4.3.6 Adrenalectomia fictícia (Sham)

Os animais foram anestesiados e operados da mesma maneira anteriormente descrita, porém, sem a retirada das glândulas adrenais.

Após a cirurgia, a posterior manutenção dos animais foi realizada nas mesmas condições do grupo adrenalectomizado, exceto com relação à salina hipertônica 2%, que não foi ministrada a esse grupo.

4.3.7 Infecção e simulação

Decorridos cinco dias após o ato cirúrgico, os animais do Grupo Infectado foram inoculados i.p. 1×10^5 tripomastigotas sangüícolas. A contagem dos parasitos foi feita pelo Método de BRENER (1962), que consiste em colocar uma alíquota de 5 μ l de sangue infectado em uma lâmina de microscópio, cobrindo-a com lamínula 22x22mm, determinando assim o número de parasitos em 50 campos. O número encontrado foi multiplicado pelo fator do microscópio, calculado para cada objetiva, levando em consideração o número de campos microscópios existentes na área da lamínula. O ajuste final do número de parasitos foi feito através da diluição do sangue em NaCl 0,15M.

No Grupo Controle, foi simulada a infecção com a inoculação i.p. de 0,1ml de NaCl 0,15M para induzir o mesmo estresse do grupo infectado.

4.3.8 Reposição de dexametasona

A reposição de dexametasona foi realizada mediante a administração intramuscular deste corticóide sintético na dose de 0,4mg/Kg 24 horas, diluída em NaCl 0,15M por volta das 17:00 horas, durante o período experimental (WING et al., 1993).

A periodicidade da reposição hormonal foi diária, até atingir os períodos propostos nos experimentos: 5º, 9º, 14º e 23º dias.

4.3.9 Eutanasia

Os animais foram eutanasiados por decapitação, no sentido de minimizar ao máximo o estresse, e consequentemente, prevenir a liberação de altos níveis de corticóides (TUFFERY, 1987).

4.3.10 Parasitemia

A contagem dos parasitos foi feita através do Método de BRENER (1962), e os níveis de parasitemia foram controlados no 5º, 9º, 14º e 23º dias após o inóculo infectante.

4.3.11 Coleta de sangue para exame hematológico.

Após a morte do animal, foi coletado cerca de 1,5ml de sangue em um tubo plástico (Falcon), contendo 0,05µl de Heparina Sódica (1ml/5.000U.I. - ORGANON TEKNIKA), para determinação da parasitemia e do hemograma.

4.3.12 Microhematócrito

A técnica utiliza tubos capilares de 3mm de diâmetro heparinizados. O sangue é coletado até $\frac{3}{4}$ do seu volume total, selando-se uma das extremidades e

submetendo-o a uma centrifugação em alta rotação por 5 minutos, em centrífuga especial capaz de exercer uma força de 12.000g.

O volume ocupado pelos eritrócitos foi medido através de uma escala, e o resultado foi expresso em porcentagem (%) (DACIE & LEWIS, 1984).

4.3.13 Contagem de eritrócitos e leucócitos

A contagem de eritrócitos e leucócitos foi feita utilizando-se soluções diluentes específicos para glóbulos vermelhos e brancos. Para contagem de eritrócitos usou-se a Solução de Gawer (4ml/ 20 μ l de sangue) e para os leucócitos a Solução de Turk (380 μ l/20 μ l de sangue).

O resultado final de ambos foi obtido através da contagem em Câmara de Neubauer do número de elementos em suas respectivas áreas, multiplicado pela diluição adotada e pelo fator de conversão. Os valores foram expressos em número de células/mm³ (DACIE & LEWIS, 1984).

4.3.14 Contagem de plaquetas

A contagem de plaquetas foi realizada segundo o Método de BRECHER & CROMKITE (1950), que utiliza como solução diluente, oxalato de amônio a 1% (4ml/20 μ l de sangue). Trata-se de um método direto, onde o diluente promove a lise dos eritrócitos e leucócitos, deixando livre as plaquetas e permitindo uma melhor visualização e contagem em Câmara de Neubauer do número de elementos em suas respectivas áreas. Os valores foram expressos em plaquetas/mm³.

4.3.15 Contagem de macrófagos

Foi realizado um lavado peritonial, mediante injeção de 10ml de solução NaCl 0,15M (estéreis), e após um leve massageamento do peritônio, o líquido foi retirado e colocado em tubos de plástico (Falcon). Utiliza-se uma solução de Turk (360 μ l/40 μ l de lavado peritonial), para melhor visualização. Os macrófagos são contados em Câmara de Neubauer e o resultado é expresso em células/mm³.

4.3.16 Dosagem de hemoglobina

Foi feito pelo método da cianometahemoglobina, segundo DRABKIN e AUSTIN (1932), com modificações citadas por DACIE & LEWIS (1984).

Para obter a porcentagem de hemoglobina, foram utilizados tubos de vidro contendo 5ml de Solução de Drabkin para 20 μ l de sangue, com a finalidade de causar lise dos eritrócitos e a liberação da hemoglobina. A intensidade de cor foi medida através de leitura em espectrofotômetro a uma absorbância de 545nm, juntamente com uma dosagem padrão de hemoglobina determinada (kit Labtest) e, em seguida, foram realizados os cálculos: % de hemoglobina do sangue da amostra X 10,0 : padrão de hemoglobina obtido. O valor foi expresso em porcentagem.

4.3.17 Método estatístico

Foi utilizado para analisar os dados o método estatístico não-paramétrico One Way Anova, complementado por Bonferroni.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Parasitemia

Os resultados obtidos ilustrados no gráfico (Figura 1), representa a curva parasitêmica de ratos *Wistar* machos, dos grupos controle (C), sham (SH), adrenalectomizados (ADX) e adrenalectomizados com reposição de dexametasona (A+D). Todos os grupos apresentaram pico parasitêmico no 9º dia de infecção.

Já o grupo ADX apresentou valores significativamente mais elevados de parasitas, em comparação aos demais grupos. Porém, o grupo A+D mostrou um decréscimo da parasitemia.

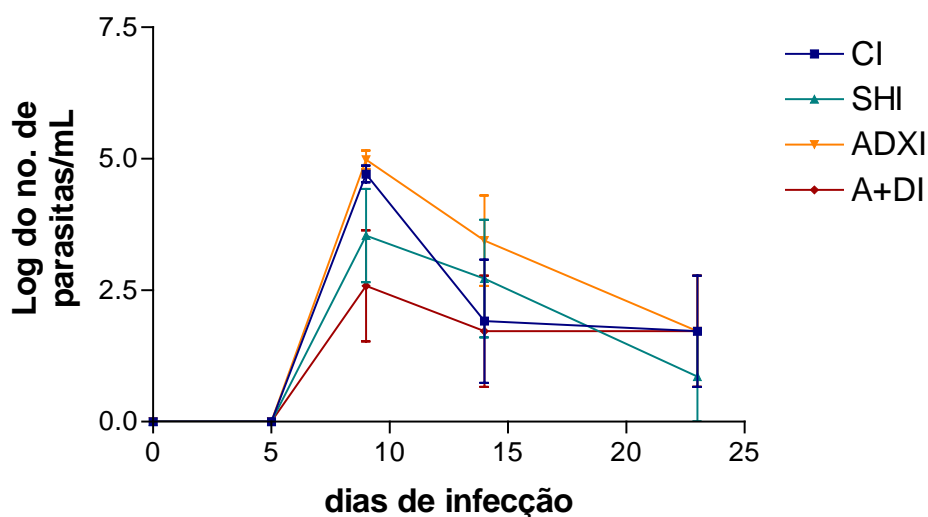


Figura 1. Evolução da parasitemia em ratos *Wistar* machos infectados com 1×10^5 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Grupos controle infectado (CI), Sham infectado (SHI), Adrenalectomizado infectado (ADX) e Adrenalectomizado com reposição de dexametasona infectado (A+DI).

Como apresentado nos resultados (Figura1), verificou-se que o pico de parasitemia manteve-se constante no 9º dia após o inóculo, para os quatro grupos experimentais (controle, sham, adrenalectomizado e adrenalectomizado com reposição de dexametasona).

O perfil da curva parasitêmica do grupo Controle apresentou-se um pouco maior que o grupo Sham, porém estatisticamente não significativo. No grupo Sham os dados podem ser explicados devido:

- A cirurgia por si só, pode ser considerada como um estímulo estressor, levando os animais a um estado de imunossupressão, agravando as manifestações fisiopatológicas durante a fase aguda da doença.
- Os ratos *Wistar* utilizados não eram isogênicos, o que determina uma variabilidade de respostas imunológicas distintas, e dependendo da idade do animal, podem ser resistentes a uma grande variedade de cepas de *T.cruzi*.
- Com um *n* máximo de 5 animais por dia de experimento para cada grupo, as variações apresentadas podem ser resultantes de diferenças mínimas no volume do inóculo, como também, distintas respostas imunológicas, refletindo diferentes parasitemias.

O grupo A+DI apresentou o menor nível de parasitemia dentre os grupos. A princípio pode-se pensar, que o grupo A+DI deveria estar mais imunossuprimido e, conseqüentemente, apresentar maiores parasitemias. Porém, vários fatores podem estar envolvidos, como a própria infecção, que pode ser considerada como um estímulo

estressor. Para compreender este fato, é necessário averiguar os princípios básicos do estresse. O estresse pode ser ocasionado por diferentes estímulos como físicos, químicos, psicológicos ou causados por agentes infecciosos.

A reação de estresse compreende três fases: Reação de alarme, reação de resistência e reação de exaustão (NELSON, 2000).

Imediatamente após a exposição ao estímulo estressor, inicia-se em segundos, uma série de respostas fisiológicas ao estresse: o sistema nervoso simpático libera noradrenalina. Momentos depois o hipotálamo libera CRH que irá estimular a secreção de ACTH (endorfinas), que por sua vez, imediatamente ativa a córtex da glândula adrenal a produzir e liberar os glicocorticóides. Ao mesmo tempo, em outros órgãos endócrinos, diversos hormônios são concomitantemente secretados, como prolactina, glucagon, hormônios tiroideos e vasopressina. Todos esses eventos participam da reação adaptativa de alarme que consta de:

- Aumento imediato da disponibilidade de energia; maior mobilização de leucócitos; aumento da captação de oxigênio; diminuição da dor e da percepção; aumento da cognição e da função sensorial. Quanto ao sistema imune, apresenta função ambígua aumentando ou inibindo a magnitude de suas respostas, dependendo da fase de infecção.

Ao observar os dados, verificou-se que isto acontece no pico de parasitemia, ou seja, no 9º dia após a infecção, significando que este período de tempo é muito curto para caracterizar uma reação de resistência ou exaustão.

Primeiramente, os animais foram adrenalectomizados, retirando toda a fonte de glicocorticóides endógenos. Posteriormente, realizou-se o inóculo infectante

com 1×10^5 formas de tripomastigotas (SOGAYAR et al, 1993). Esta quantidade de inóculo, não constitui para esta espécie um risco eminente de morte. Os animais acabam morrendo em um espaço de tempo relativamente curto (após 25 dias), mas não devido à presença de *T.cruzi*, mas sim, em decorrência da ausência dos hormônios mineralocorticoides produzidos pela glândula adrenal. Além disso, os animais adrenalectomizados não exibem qualquer anormalidade notável no metabolismo de carboidratos se tiver uma alimentação, que mantenha as concentrações de glicose no plasma. Porém, se estes animais passarem por um período breve de jejum, diminuem suas reservas de glicogênio hepático e muscular, e estes desenvolvem uma hipoglicemia (GOODMAN, 1983), sendo agravada devido a infecção chagásica.

Concomitantemente à infecção, inicia-se a terapia de reposição por dexametasona. Deve-se ter em mente que esta substância é imunossupressora, mas alguns autores como FANTUZZI, et al., (1994), demonstram que suas ações podem ser ambíguas, dependendo do tipo de tratamento. Levanta-se ainda o fato de que a vida média útil desta droga na circulação é relativamente longa (36 a 72 horas), e a uma concentração de 0,75mg/kg em 24hs como realizado no trabalho, garante níveis constantes desta substância, porém em concentrações diferentes das encontradas fisiologicamente no animal.

4.4.2 Hemograma

A caracterização do leucograma e do eritrograma em ratos *Wistar*, machos foi realizada nos grupos controle (C), sham (SH), adrenalectomizados (ADX) e adrenalectomizados com reposição dexametasona (A+D), infectados e não-infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, e os dados obtidos foram analisados estatisticamente.

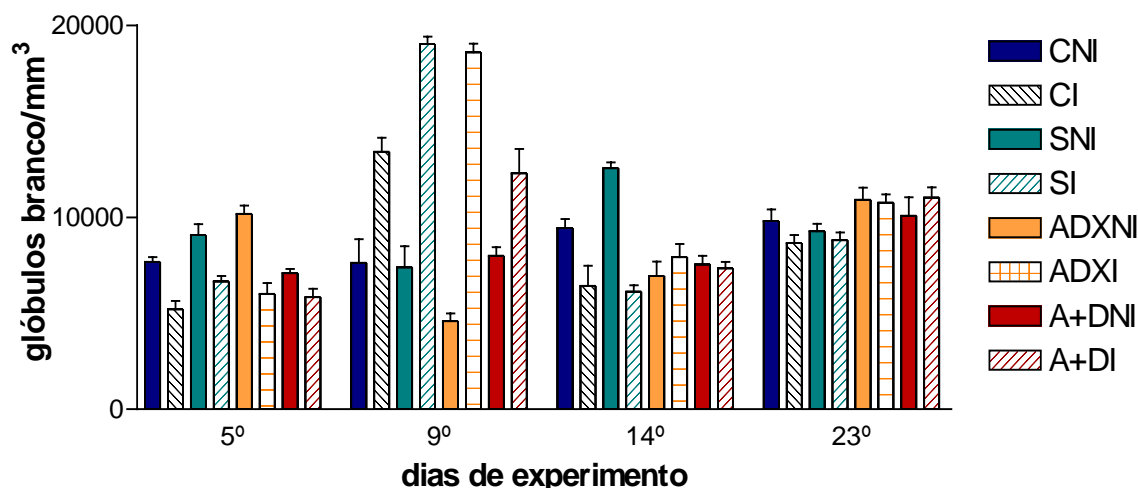


Figura 2. Número de leucócitos presentes em ratos *Wistar* machos infectados ou não com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Os grupos analisados: controle não-infectado (CNI), controle infectado (CI), sham não-infectado (SNI), sham infectado (SI), adrenalectomizado não-infectado (ADXNI), adrenalectomizado infectado (ADXI), adrenalectomizado com reposição de dexametasona não-infectado (A+DNI) e adrenalectomizado com reposição de dexametasona infectado (A+DI). Estatisticamente nenhum dos grupos apresentou diferenças significativas.

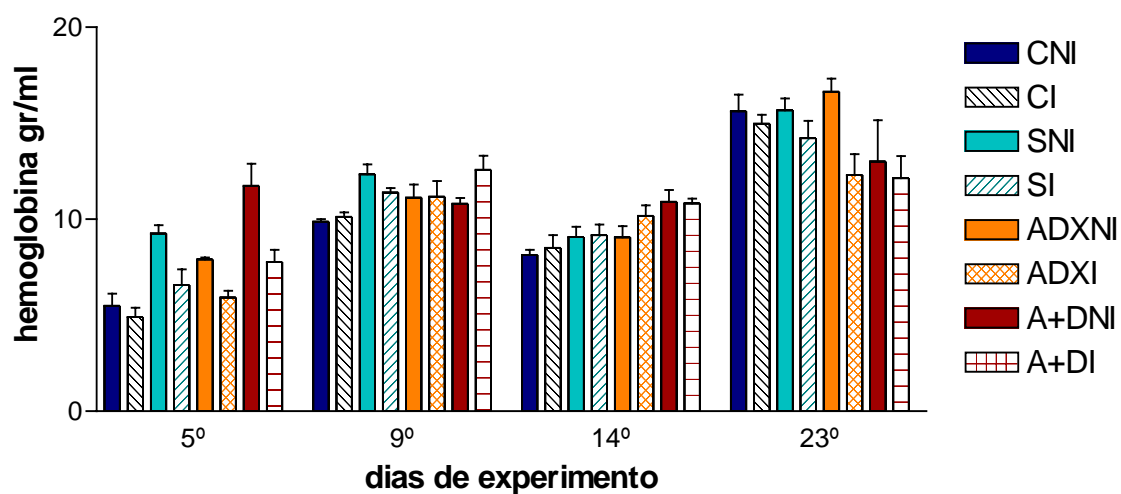


Figura 3. Quantidade de hemoglobina presente em ratos *Wistar* machos infectados ou não com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Os grupos analisados: controle não-infectado (CNI), controle infectado (CI), sham não-infectado (SNI), sham infectado (SI), adrenalectomizado não-infectado (ADXNI), adrenalectomizado infectado (ADXNI), adrenalectomizado com reposição de dexametasona não-infectado (A+DNI) e adrenalectomizado com reposição de dexametasona infectado (A+DI). Estatisticamente nenhum dos grupos apresentou diferenças significativas.

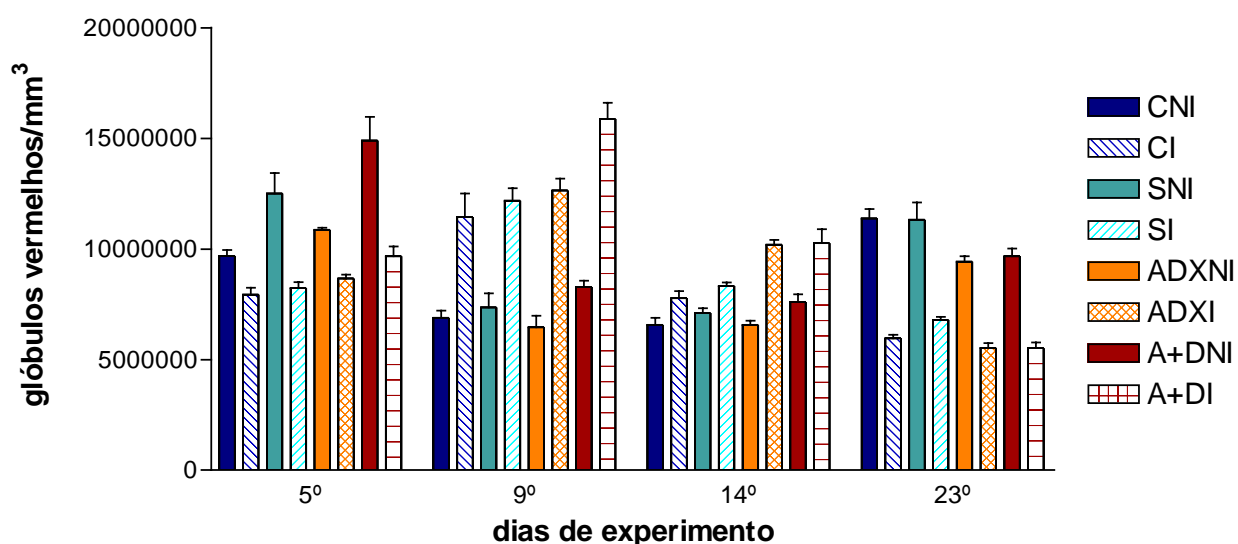


Figura 4. Número de eritrócitos presentes em ratos *Wistar* machos infectados ou não com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Os grupos analisados: controle não-infectado (CNI), controle infectado (CI), sham não-infectado (SNI), sham infectado (SI), adrenalectomizado não-infectado (ADXNI), adrenalectomizado infectado (ADXNI), adrenalectomizado com reposição de dexametasona não-infectado (A+DNI) e adrenalectomizado com reposição de dexametasona infectado (A+DI). Estatisticamente nenhum dos valores obtidos pelos grupos teve diferenças significativas.

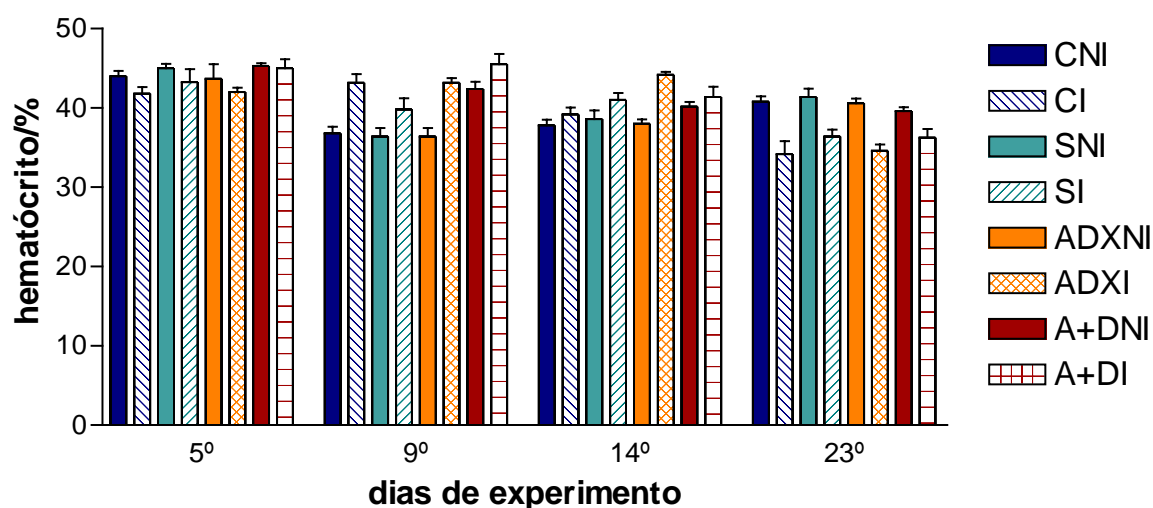


Figura 5. Porcentagem de hematócrito presente em ratos *Wistar* machos infectados ou não com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Os grupos analisados: controle não-infectado (CNI), controle infectado (CI), sham não-infectado (SNI), sham infectado (SI), adrenalectomizado não-infectado (ADXNI), adrenalectomizado infectado (ADX I), adrenalectomizado com reposição de dexametasona não-infectado (A+DNI) e adrenalectomizado com reposição de dexametasona infectado (A+DI). Estatisticamente nenhum dos valores apresentados pelos grupos teve diferenças significativas.

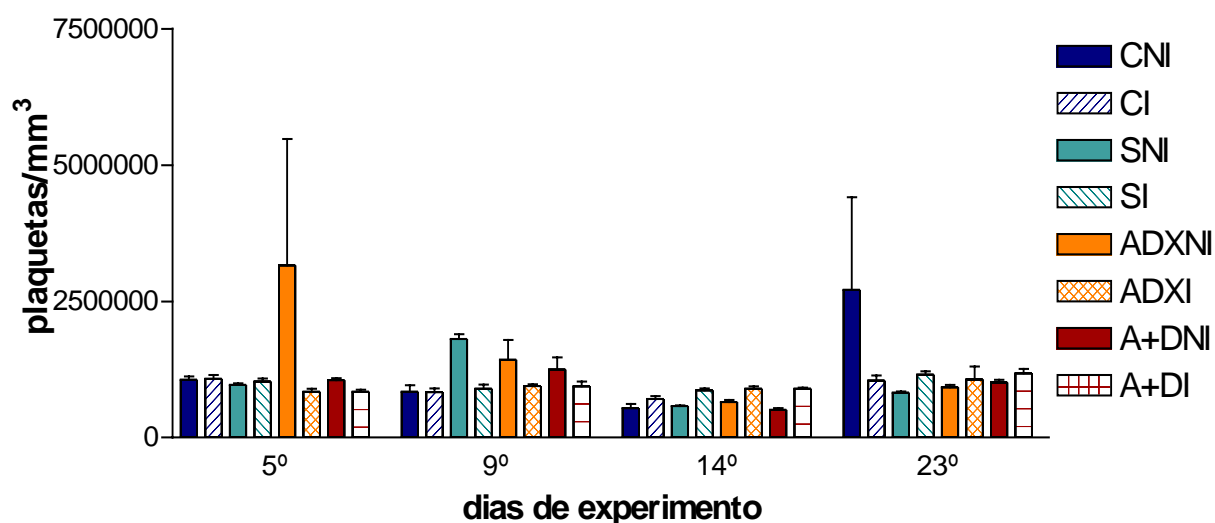


Figura 6. Número de plaquetas presente em ratos *Wistar* machos infectados ou não com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Os grupos analisados: controle não-infectado (CNI), controle infectado (CI), sham não-infectado (SNI), sham infectado (SI), adrenalectomizado não-infectado (ADXNI), adrenalectomizado infectado (ADXI), adrenalectomizado com reposição de dexametasona não-infectado (A+DNI) e adrenalectomizado com reposição de dexametasona infectado (A+DI). Nenhum dos grupos apresentou diferenças significativas.

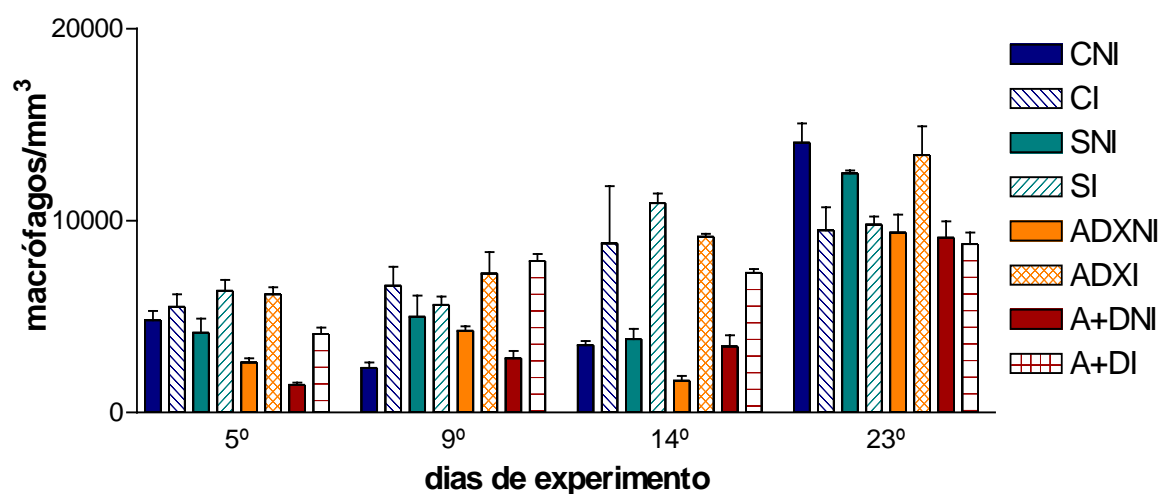


Figura 7. Número de macrófagos peritoneais presentes em ratos *Wistar* machos infectados ou não com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Os grupos analisados: controle não-infectado (CNI), controle infectado (CI), sham não-infectado (SNI), sham infectado (SI), adrenalectomizado não-infectado (ADXNI), adrenalectomizado infectado (ADXI), adrenalectomizado com reposição de dexametasona não-infectado (A+DNI) e adrenalectomizado com reposição de dexametasona infectado (A+DI). Nenhum dos grupos obteve diferenças significativas.

A análise estatística dos dados obtidos, representados nos gráficos do hemograma, não mostrou diferença significativa para todas as amostras, tanto na série vermelha como na série branca dos grupos estudados.

A contagem de leucócitos não teve variações significativas, ocorrendo apenas uma discreta leucocitose para os animais do grupo infectado quando comparados aos grupos não infectados, principalmente no 9º dia de experimento (pico de parasitemia). Nos animais A+D houve uma discreta neutrofilia o que está de acordo com as citações de GOODMAN et al., 1983, que relata um aumento do número de neutrófilos circulantes. RASSI (1979) observa um perfil linfomonocitário, com marcante neutropenia na fase aguda da infecção. Porém, estatisticamente as comparações não foram significativas.

Há também uma tendência de ter maior aumento das concentrações de hemoglobina, eritrócitos e hematócrito no 5º, 9º e 14º dias após o inóculo, principalmente nos animais do grupo A+D infectados e não-infectados, que receberam doses de glicocorticóide sintético. Isto está de acordo com dados da literatura, que relata um ligeiro aumento da hemoglobina e hemácias periféricas causados pelos glicocorticóides (GOODMAN, et al., 1983). Tal fato é muito freqüente na doença de Cushing, onde existe policitemia, em decorrência do excesso de produção de glicocorticóides. Também, os animais não apresentaram nenhum sinal de anemia, podendo esta, ocorrer em diferentes graus para as distintas espécies de mamíferos infectados. TITTO e ARAÚJO (1988) descrevem a possibilidade de que a neuroaminidase tenha um papel importante na hemólise causada durante o curso da infecção chagásica.

Em seres humanos, a anemia na fase aguda nem sempre se encontra presente, sendo um dado relativamente raro, devido à dificuldade de se evidenciar, com segurança, o momento da infecção e o subsequente desenvolvimento da fase aguda.

O inóculo realizado de 1×10^5 formas de tripomastigota demonstra que não foi suficiente para provocar no organismo dos animais uma anemia, motivo pelo qual não se evidenciou queda no número de eritrócitos, plaquetas e hemoglobina.

Conforme anteriormente explanado, as poucas alterações apresentadas são provavelmente decorrentes não apenas da adrenalectomia, mas também, da infecção chagásica experimental. O tempo necessário para que se estabeleça uma terapia de reposição efetiva é muito curto, de modo que o organismo não tem tempo hábil de mobilizar elementos figurados do sangue periférico para estabelecer um quadro característico. Provavelmente, se esses animais ficassem vivos e entrassem na fase crônica da doença, certamente poderia defrontar-se com alterações importantes, decorrentes das intervenções que ocorreram na fase aguda da doença.

5. Capítulo II

Regulação do Óxido Nítrico em ratos *Wistar* machos adrenalectomizados infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

5.1 Resumo

O Óxido Nítrico (NO) desempenha um importante papel no desenvolvimento da infecção por *Trypanosoma cruzi*. Estes radicais, sendo produzidos por macrófagos, que são a primeira linha de defesa do organismo, são responsáveis pela atividade microbicida de patógenos intracelulares.

Os sinais mais importantes para a ativação dos macrófagos são: o IFN- γ e o TNF- α , bem como, fatores inespecíficos, como os lipolissacarídeos (LPS). Diante destes fatos, foram realizados neste trabalho, ensaios de dosagens de NO, tanto de macrófagos peritoniais, como de células do baço, em grupos de animais adrenalectomizados, com ou sem reposição dexametasona, comparados com os grupos controle e Sham, permitindo a verificação das influências da adrenalectomia, juntamente com a infecção chagásica experimental sobre a resposta imune. Os resultados obtidos mostraram que mesmo com a falta de glicocorticóides, não houve alterações significativas nos níveis de NO. Os grupos operados e com reposição de dexametasona (A+D), não apresentaram diminuição dos níveis de NO. Ao contrário, alcançaram níveis mais significativos desta molécula efetora, controlando de modo eficaz a parasitemia.

5.2 Introdução

A tripanosomíase americana é uma zoonose causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Até hoje, a ciência ainda tem se empenhado em tentar controlar e entender melhor esta endemia que afeta quase toda a América Latina, sendo apontada como uma das principais causas de morbidade entre as populações carentes da América do Sul (LOPES et al, 1994), onde mais de 18 milhões de pessoas já foram infectadas (WHO, 2000).

Vários modelos experimentais podem ser utilizados no intuito de avaliar experimentalmente a evolução da Doença de Chagas, como, por exemplo, ratos *Wistar* (WING, et al., 1993).

Existem várias evidências da comunicação bidirecional entre os sistemas imune e neuroendócrino. Poucos são os trabalhos envolvendo hormônios e a presença de *T.cruzi*, e a maioria deles, relata os diferentes mecanismos de ação desses hormônios, contribuindo ou não para a ruptura da homeostase corpórea, agravando ou não a infecção.

Os hormônios da glândula adrenal, principalmente a corticosterona (CT) presente nos ratos, possui ação anti-inflamatória, ajudando o organismo do hospedeiro a minimizar a intensidade dos processos inflamatórios. Em humanos uma substância análoga é o cortisol, que também pode ser utilizada como agente terapêutico no tratamento de doenças autoimunes. Além disso, os corticosteróides influenciam negativamente a magnitude da resposta imune, deprimindo a produção de inúmeras interleucinas e reduzindo a blastogênese de células T. Quando se retira esta fonte de produção hormonal, por meio da adrenalectomia, ou quando se repõe a corticosterona

no rato, com a utilização de glicocorticóides sintéticos, como a dexametasona, pode-se produzir uma série de respostas adaptativas.

Sabe-se que no Sistema Imunológico, as formas tripomastigotas infectantes, irão parasitar primeiramente, as células do sistema fagocitário mononuclear, principalmente os macrófagos, que são ativados pelo IFN- γ , que é considerado um importante fator para a destruição de *T.cruzi*, além de TNF- α e fatores inespecíficos, como o LPS (PLATA et al., 1984; MURRAY et al., 1985; ALCINA & FRESNO, 1987; SZTEIN, et al, 1993).

Os macrófagos desempenham uma importante função contra a infecção por *T.cruzi* via peroxidase, óxido nítrico e produção de peroxinitrito, onde este último mostrou-se citotóxico contra as formas epimastigotas deste parasita (THOMSON et al., 1999).

Quando os macrófagos são ativados, liberam o óxido nítrico (NO) que está envolvido em várias funções biológicas, como a vasodilatação sangüínea, agregação de plaquetas e neurotransmissão (MONCADA et al., 1991). Além disso, o NO é considerado uma molécula efetora antimicrobicida em macrófagos contra patógenos intracelulares como *T.cruzi* (GAZZINELLI, et al., 1992).

O óxido nítrico foi considerado uma molécula de poluentes ambientais, e foi capaz de unir a neurociência, a fisiologia e a imunologia de forma a alterar o conhecimento a respeito da comunicação e defesa celular.

O óxido nítrico é sintetizado a partir da oxidação do átomo de nitrogênio guanidínico terminal da L-arginina para L-citrulina (PALMER et al., 1988, GARCIA et al.,

1999) por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), na presença de O^2 e NADPH, requerendo como cofatores, flavoproteínas, tetrahydro-L-biopterina (BH4) e glutatina (GSH). O óxido nítrico é uma molécula altamente reativa que possui vida média de 3 a 60 segundos devido a sua rápida oxidação e, conseqüentemente, geração de nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) (HEVEL et al., 1991; STAMLER et al., 1992).

A enzima NOS apresenta 3 isoformas, as quais já foram clonadas e com capacidade de formar NO. A isoforma NOSn ou tipo I, é encontrada no tecido cerebral; a isoforma NOSe ou tipo III identificada como constitutiva nas células endoteliais dos vasos; e a isoforma NOSi ou tipo II, identificada como induzida por citocinas em macrófagos (GIVALOIS, et al., 2002). A expressão da NOSi em macrófagos é induzida após o estímulo imunológico, e necessita de transcrição do DNA (LORSBACH et al., 1993).

Apesar das citocinas participarem do controle da infecção por *T.cruzi*, não conferem resistência completa a estes parasitas, que permanecem no organismo causando uma possível doença crônica. O aumento dos níveis de produção de NO pelos macrófagos, eleva a destruição ou até mesmo a eliminação total destes parasitas intracelulares (GOLDEN & TARLETON, 1991; NORRIS et al., 1995).

PETRAY et al. (1994), relataram que o aumento dos níveis de produção de NO, está relacionado com a redução da parasitemia em camundongos experimentalmente infectados. Porém, altos níveis de NO, causam uma ação patogênica no indivíduo infectado, incluindo a depressão da função do miocárdio e morte celular (KELLY et al., 1996; CHADRASEKAR et al., 1998, MACHADO, et al., 2000).

Portanto, pode-se dizer que a multiplicação intracelular de *T.cruzi in vivo* e *in vitro* pode ser controlada pela síntese do NO. Em camundongos, as citocinas que induzem esta produção, atingem um pico plasmático entre o 8º - 12º dias após à infecção (MARTINS et al., 1998).

Baseando-se nas premissas anteriores, o presente trabalho verificou a capacidade de produção ou inibição de NO, em células do peritônio e esplenócitos, de ratos *Wistar* infectados ou não com a cepa Y de *T.cruzi*, que foram submetidos a adrenalectomia com e sem reposição de dexametasona, em comparação com os grupos controle e sham, em dias pré-determinados de experimentação.

5.3 Material e Métodos

5.3.1 Animais utilizados

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar*, jovens, pesando entre 100 e 110 gr, provenientes de uma colônia mantida no biotério da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Esses animais foram ambientados no biotério da FCFRP-USP, sendo mantidos a uma temperatura ambiente de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, num ciclo claro/escuro 12/12 horas com a água e ração da marca Nuvilab *ad libitum*.

5.3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos e identificados como:

Grupo Controle:

CNI - Animais não operados e não infectados (n = 5)

SNI – Animais sham não infectados (n = 5)

ADXNI – Animais Adrenalectomizados não infectado (n = 5)

A+DNI - Animais Adrenalectomizado não infectado com reposição de dexametasona (n = 5)

Grupo Infectado:

CI – Animais não operados e infectados com *T.cruzi* (n = 5)

SI – Animais sham infectados com *T.cruzi* (n = 5)

ADXI – Animais Adrenalectomizado infectados com *T.cruzi* (n = 5)

A+DI – Animais Adrenalectomizado infectados com *T.cruzi* e com reposição de dexametasona (n = 5)

Foi utilizado um total de 20 animais por dia de experimento.

5.3.3 Dias de experimento

Os experimentos foram realizados em dias pré-determinados, após a infecção: na fase inicial da doença (5^o.), no pico da parasitemia (9^o.), na fase descendente (14^o.). Estes dias foram escolhidos baseados na curva parasitêmica, onde o pico ocorre entre o 9^o e 12^o, após o inóculo. Para cada dia de experimento, foram sacrificados 5 animais de cada grupo.

5.3.4 Parasitas

Utilizou-se a cepa Y de *T.cruzi*, isolada por SILVA & NUSSENZWEIG (1953), através de xenodiagnóstico realizado em uma paciente na fase aguda da infecção chagásica. Desde então, vem sendo mantida em camundongos Swiss heterogênicos, por meio de repiques semanais.

Trata-se de uma cepa com predominância de formas delgadas, multiplicação rápida e picos parasitêmicos precoces, determinando alta mortalidade em camundongos e tropismo tecidual preferencialmente para as células do sistema fagocitário mononuclear, parasitando com frequência esplenócitos, hepatócitos e medula óssea (ANDRADE, 1976), causando lesões tissulares graves.

5.3.5 Adrenalectomia

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de Tribromoetanol (TBE) a 2,5% (0,025g/ml), diluído em NaCl 0,15M, sendo injetado 1ml a cada 100g de peso corporal. A incisão foi feita na pele e tecido subcutâneo na linha média, tendo como referência o ângulo entre a última costela e a coluna vertebral. Após a visualização dos órgãos abdominais, com uma pinça sem dentes, foi pinçada a gordura peri-renal abaixo da adrenal, removendo estas glândulas. Após o ato cirúrgico, os animais foram colocados em caixas estéreis, com maravalha e ração, sendo imediatamente aplicada uma injeção de pentabiótico (0,1ml/kg), com o intuito de prevenir possíveis infecções bacterianas. Os animais receberam *ad libitum* água filtrada, ração e salina hipertônica 2%, juntamente com antibiótico (Amoxilina), diluído em água no volume de 0,75g/ml para cada animal durante 5 dias.

5.3.6 Adrenalectomia fictícia (Sham)

Os animais foram anestesiados e operados da mesma maneira anteriormente descrita, porém, sem a retirada das glândulas adrenais.

Após a cirurgia, a posterior manutenção dos animais foi realizada nas mesmas condições do grupo adrenalectomizado, exceto com relação à salina hipertônica 2%, que não foi ministrada a esse grupo.

5.3.7 Infecção ou simulação

Decorridos cinco dias após o ato cirúrgico, os animais do Grupo Infectado foram inoculados i.p. 1×10^5 tripomastigotas sangüícolas. A contagem dos parasitos foi

feita pelo Método de BRENER (1962), que consiste em colocar uma alíquota de 5 μ l de sangue infectado em uma lâmina de microscópio, cobrindo-a com lamínula 22x22mm, determinando assim o número de parasitos em 50 campos. O número encontrado foi multiplicado pelo fator do microscópio, calculado para cada objetiva, levando em consideração o número de campos microscópios existentes na área da lamínula. O ajuste final do número de parasitos é feito através da diluição do sangue em NaCl 0,15M.

No Grupo Controle, foi simulada a infecção com a inoculação i.p. de 0,1ml de NaCl 0,15M para simular o mesmo estresse do grupo infectado.

5.3.8 Reposição de dexametasona

A reposição de dexametasona foi feita mediante a administração intramuscular deste corticóide sintético na dose de 0,4mg/Kg 24 horas, diluída em solução fisiológica 0,9% e realizada por volta das 17:00 horas, durante o período experimental (WING et al., 1993).

A periodicidade da reposição hormonal, foi diária, até atingir os períodos dos experimentos: 5^o, 9^o e 14^o dias.

5.3.9 Eutanasia

Os animais foram eutanasiados por decapitação, no sentido de minimizar ao máximo o estresse, e conseqüentemente, prevenir a liberação de altos níveis de corticóides (TUFFERY, 1987).

5.3.10 Quantificação do NO em macrófagos

Foram realizados ensaios de produção de óxido nítrico em macrófagos do peritônio e do baço.

Os ratos tiveram a cavidade peritoneal lavada com 10ml de RPMI a 4° C, que foi centrifugado por 10 min. à 1500rpm e seu sobrenadante desprezado. Ressuspendeu-se o “pellet” em 1 ml de RPMI contendo 10% de soro bovino fetal e antibiótico. Desta suspensão, retirou-se uma alíquota de 10 µl que foi diluída em azul de Tripán, para contagem de células viáveis (macrófagos). Depois de contadas, tiveram concentrações ajustadas para 5×10^6 células/ml; 100µl desta suspensão foi distribuída em placa de 96 “well”, contendo 5×10^5 células/well, adicionando-se 2ng/poço de interferon, 1ng/poço de LPS e levada à estufa contendo 5% de CO₂, durante 24hs, a 37°C. Após este período, submeteu-se a placa a centrifugação à 1500rpm durante 4 min. Recolheu-se 100µl do sobrenadante e transferiu-se para outra placa de 96 poços. Em seguida, adicionou-se igual volume de reagente de Greiss, permitindo a revelação da reação por meio de leitor de microplacas, utilizando-se filtro de 540nm. A curva padrão de 200µM a 6µM foi realizada utilizando NO₃ com diluição seriada na base 2 (TERENZI et al.,1995; HRUBY et al.,1997).

Quanto ao baço, retirou-se um pedaço do órgão, sendo macerado e ressuspenso em 3ml de RPMI a 4°C. O lavado foi centrifugado por 10 min. à 1500rpm e seu sobrenadante desprezado. Ressuspendeu-se o “pellet” em 1 ml de RPMI contendo 10% de soro bovino fetal e antibiótico. Desta suspensão, retirou-se uma alíquota de 10 µl que foi diluída em azul de Tripán, para contagem se células viáveis (macrófagos). Depois de contadas, tiveram concentrações ajustadas para 5×10^6 células/ml, e 100µl

desta suspensão foi distribuída em placa de 96 “wells”, contendo 5×10^5 células/well. Adicionou-se por poço 2ng/poço de interferon, 1ng/poço de LPS sendo levada à estufa contendo 5% de CO₂, durante 24hs, a 37°C. Após este período, a placa foi centrifugada à 1500rpm durante 4 min e 100µl do sobrenadante foi recolhido e transferido para outra placa de 96 poços. Adicionou igual volume de reagente de Greiss, permitindo a revelação da reação por meio de leitor de microplacas, utilizando-se filtro de 540nm. A curva padrão de 200µM a 6µM foi realizada utilizando NO₃ com diluição seriada na base 2 (TERENZI et al.,1995; HRUBY et al.,1997).

A leitura de absorbância de ambos foi feita em aparelho de ELISA com comprimento de onda 540nm. Os resultados foram comparados com os de curva padrão de NO, feita a partir de concentrações conhecidas de nitrito de sódio (SALTZMAN, 1954; GREEN et al., 1982).

5.3.11 Método estatístico

Foi utilizado para analisar os dados o método estatístico não-paramétrico One Way Anova, complementado por Bonfferroni.

5.4 Resultados e Discussão

5.4.1 Análise da dosagem de NO – células do peritônio

As figuras abaixo representam os resultados obtidos na avaliação de produção de óxido nítrico (NO), em células do peritônio, realizado nos animais Controle, Sham, Adrenalectomizados (ADX) e Adrenalectomizados com reposição de dexametasona (A+D). Foram feitas amostras somente com meio (RPMI), e outras com o meio mais estímulos (INF- γ e LPS), de animais não-infectados e infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Os dias avaliados foram: 5º, 9º e 14º dias.

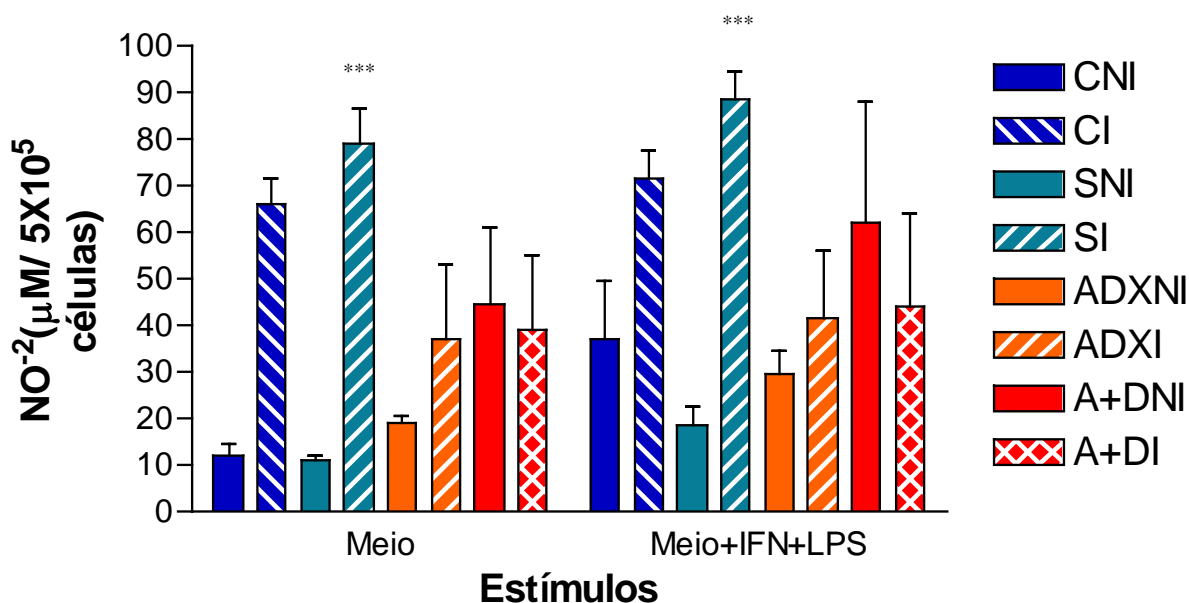


Figura 1. Dosagem de NO das células do peritônio de animais não-infectados e infectados durante o 5º dia de experimento. Os grupos: Controle não-infectado (CNI), Controle infectado (CI), Sham não-infectado (SNI), Sham infectado (SI), Adrenalectomizados não-infectados (ADXNI), Adrenalectomizados infectados (ADXI), Adrenalectomizados com reposição de dexametasona não-infectados (A+DNI) e Adrenalectomizados com reposição de dexametasona infectados (A+DI). Nível de significância: * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e ^{ns} não significativo. Os demais grupos não foram significativos.

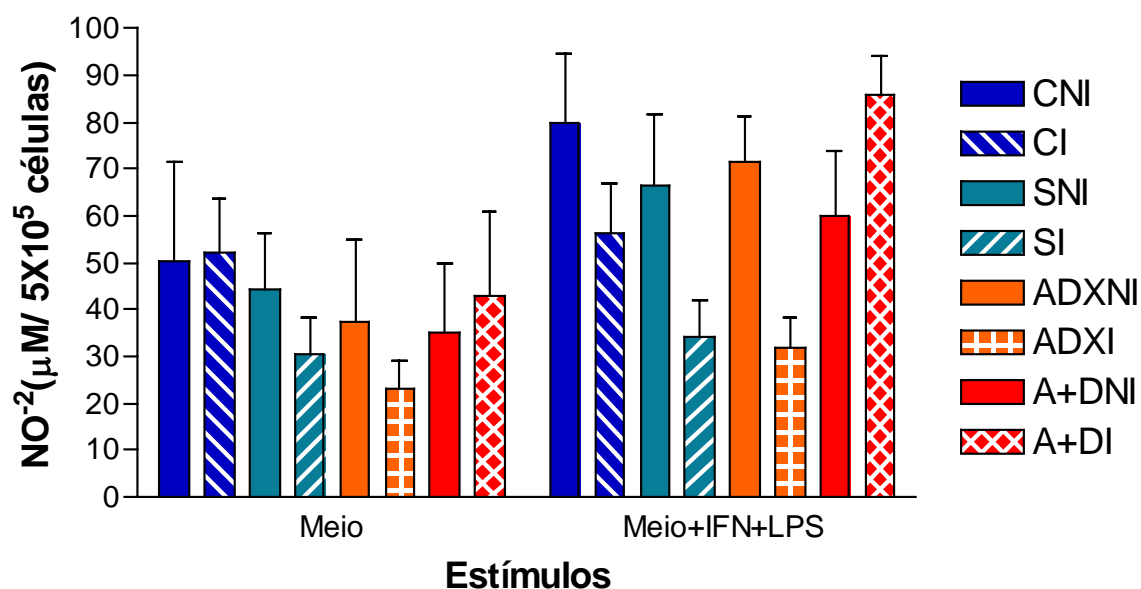


Figura 2. Dosagem de NO das células do peritônio de animais não-infectados e infectados durante o 9º dia de experimento. Os grupos: Controle não-infectado (CNI), Controle infectado (CI), Sham não-infectado (SNI), Sham infectado (SI), Adrenalectomizados não-infectados (ADXNI), Adrenalectomizados infectados (ADXI), Adrenalectomizados com reposição de dexametasona não-infectados (A+DNI) e Adrenalectomizados com reposição de dexametasona infectados (A+DI). Nível de significância: * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e ^{ns} não significativo. Nenhum dos grupos foi significativo.

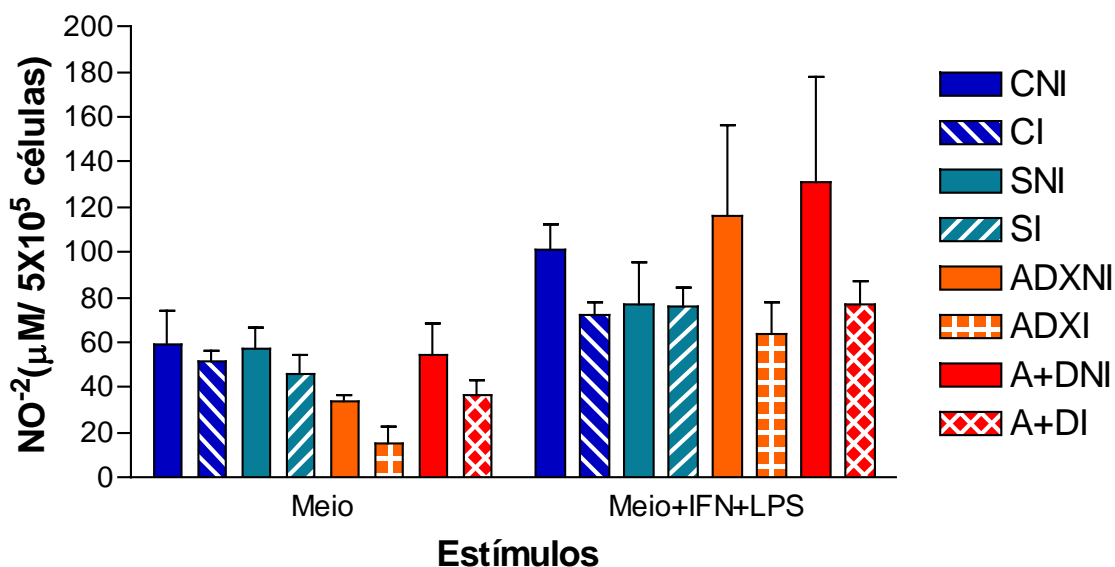


Figura 3. Dosagem de NO das células do peritônio de animais não-infectados e infectados durante o 14º dia de experimento. Os grupos: Controle não-infectado (CNI), Controle infectado (CI), Sham não-infectado (SNI), Sham infectado (SI), Adrenalectomizados não-infectados (ADXNI), Adrenalectomizados infectados (ADXNI), Adrenalectomizados com reposição de dexametasona não-infectados (A+DNI) e Adrenalectomizados com reposição de dexametasona infectados (A+DI). Nível de significância: * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e ^{ns} não significativo. Nenhum dos grupos foi significativo.

5.4.2 Análise da dosagem de NO – células do baço

As figuras abaixo representam os dados da análise da dosagem de NO produzido por células do baço, dos grupos Controle, Sham, Adrenalectomizados (ADX) e Adrenalectomizados com reposição de dexametasona (A+D). Foram feitas amostras somente com meio (RPMI), e outras com o meio mais estímulos (INF- γ e LPS), de animais não-infectados e infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Os dias avaliados foram: 5^o, 9^o e 14^o dias.

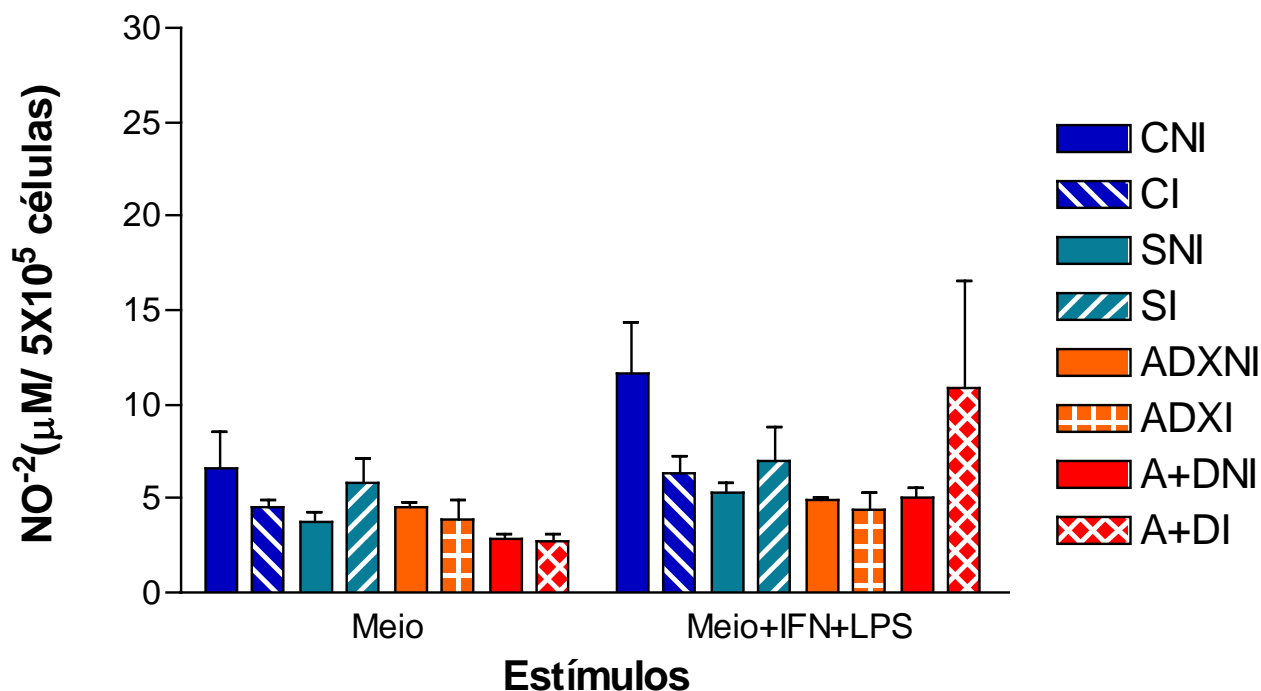


Figura 4. Dosagem de NO das células do baço de animais não-infectados e infectados durante o 5^o dia de experimento. Os grupos: Controle não-infectado (CNI), Controle infectado (CI), Sham não-infectado (SNI), Sham infectado (SI), Adrenalectomizados não-infectados (ADXNI), Adrenalectomizados infectados (ADXI), Adrenalectomizados com reposição de dexametasona não-infectados (A+DNI) e Adrenalectomizados com reposição de dexametasona infectados (A+DI). Nível de significância: * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e ^{ns} não significativo. Nenhum dos grupos foi significativo.

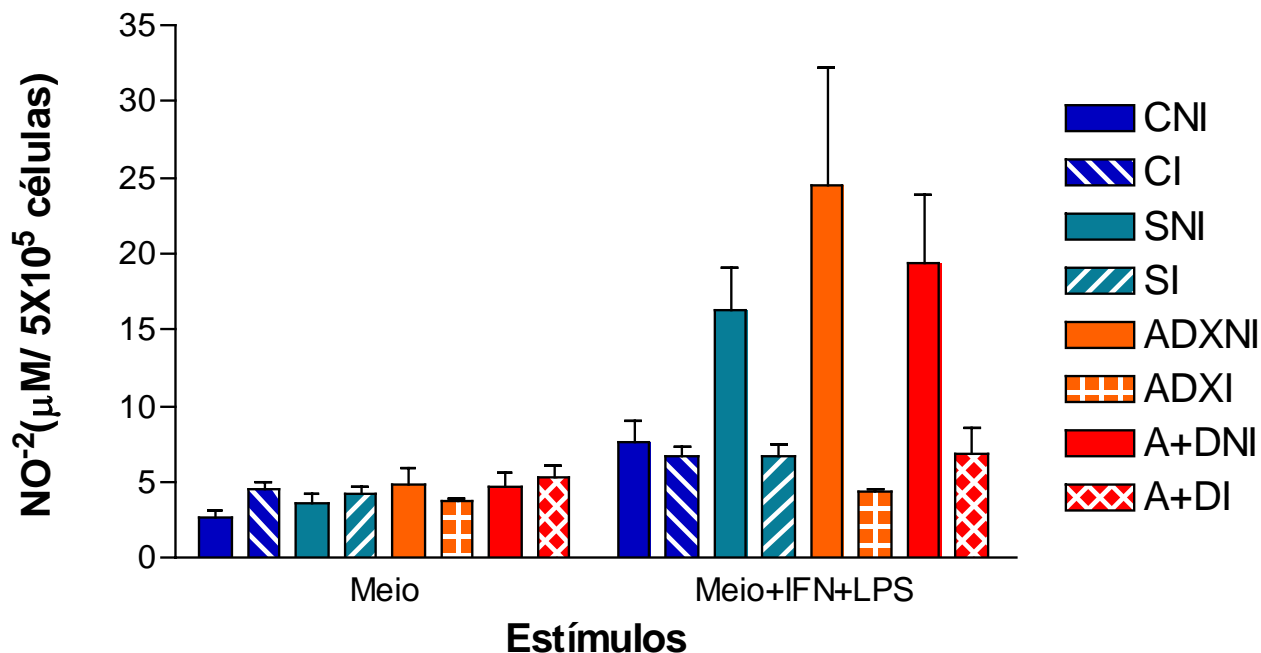


Figura 5. Dosagem de NO das células do baço de animais não-infectados e infectados durante o 9º dia de experimento. Os grupos: Controle não-infectado (CNI), Controle infectado (CI), Sham não-infectado (SNI), Sham infectado (SI), Adrenalectomizados não-infectados (ADXNI), Adrenalectomizados infectados (ADXNI), Adrenalectomizados com reposição de dexametasona não-infectados (A+DNI) e Adrenalectomizados com reposição de dexametasona infectados (A+DI). Nível de significância: * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e ^{ns} não significativo. Nenhum dos grupos foi significativo.

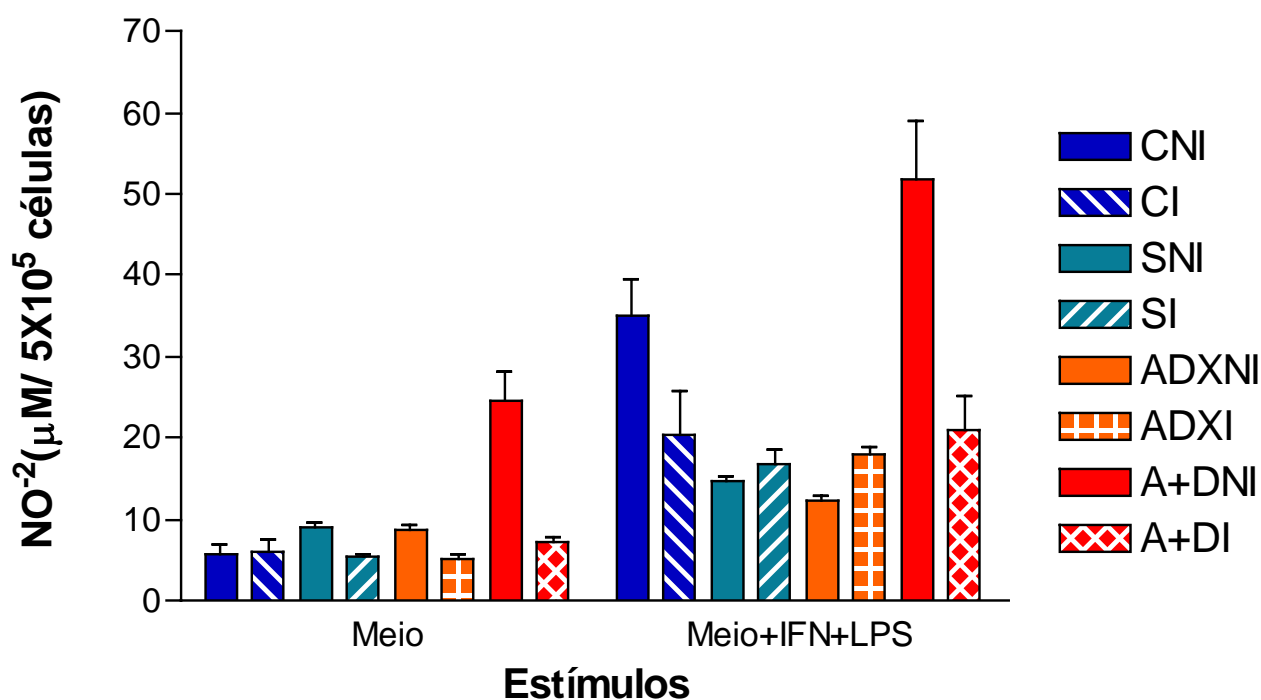


Figura 6. Dosagem de NO das células do baço de animais não-infectados e infectados durante o 14º dia de experimento. Os grupos: Controle não-infectado (CNI), Controle infectado (CI), Sham não-infectado (SNI), Sham infectado (SI), Adrenalectomizados não-infectados (ADXNI), Adrenalectomizados infectados (ADXNI), Adrenalectomizados com reposição de dexametasona não-infectados (A+DNI) e Adrenalectomizados com reposição de dexametasona infectados (A+DI). Nível de significância: * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e ^{ns} não significativo. Nenhum dos grupos foi significativo.

A dosagem de NO pode ser considerada como um método indireto para detectar o grau de infecção provocado por *T.cruzi*. PETRAY et al. (1994), relataram que o aumento dos níveis de produção de NO, está relacionado com a redução da parasitemia em camundongos experimentalmente infectados. Sabe-se que *T.cruzi* invade as células do sistema imunológico, principalmente macrófagos, desencadeando uma série de interações moleculares, que mobilizam a resposta imune inata, na tentativa de combater o parasita. No macrófago ativado, ocorre liberação de IL-12, que ativa as células NK a produzirem IFN- γ . Este sequenciamento ativa o macrófago para a ação lítica do parasita (GATELY & MULQUEE, 1996 e SIQUEIRA-BATISTA et al., 1996). Já o TNF- α , também produzido por macrófagos, participa de maneira sinérgica com a IL-12 e IFN- γ . Com isso, as citocinas produzidas ativam a expressão da enzima NO sintase (NOSi), induzida por macrófagos, promovendo um aumento da produção de NO, que é altamente tóxico para *T.cruzi* (SALVEMI & MOLLACE, 1994). Há agentes que podem inibir a síntese de NO, como corticosteróides e algumas citocinas, como IL-4, IL-10 e TGF- β (NATHAN, 1992).

Dosagem de NO em animais não infectados e infectados

A - Peritônio

Os dados do 5º dia de experimento apresentaram níveis de significância para o grupo Sham, quando comparado o grupo não-infectado com o grupo infectado, indicando que o ato cirúrgico deve ter influenciado para deixar o animal mais imunossuprimido, alterando os macrófagos e, conseqüentemente, tendo maior

produção de NO. Ainda no 5º dia de experimento os grupos ADX e A+D infectados e não-infectados tiveram uma diminuição na produção de NO, porém não significativa.

Nos 9º dia de experimento, as células peritoniais dos animais não-infectados e infectados, tiveram um aumento da produção de NO, quando comparados aos níveis do 5º dia, entretanto estatisticamente não diferem.

Já no 14º dia de experimento os níveis de produção de NO foram mais elevados, provavelmente na tentativa de controlar a parasitemia. Pois no início da fase aguda, os macrófagos sofrem uma ativação, de modo a combater o agente patogênico, representado por um discreto aumento na produção de NO.

Devido ao fato da parasitemia ser no 9º dia após o inóculo, onde se encontra os maiores números de tripomastigotas sanguíneas, a imunidade celular reage de maneira mais intensa, aumentando os níveis de NO.

O grupo que apresentou os níveis mais altos de NO foi o A+D, porém estatisticamente não foram significativos. Na realidade, nesta fase inicial da infecção, suas ações são mais direcionadas como um agente antiinflamatório, atenuando a infecção e de certa maneira contribuindo para uma melhor resposta ao patógeno. Sabe-se que a dose utilizada de dexametasona foi sub-fisiológica, baseada em trabalhos da literatura (WING et al., 1993). Como o experimento foi realizado na fase aguda da doença, não houve tempo suficiente para que as dosagens levassem o organismo a fase de exaustão. Se assim ocorresse, certamente teria um decréscimo da produção de NO.

B – Baço

Dosagem de NO em animais não-infectados e infectados

Da mesma forma que ocorreu com as células peritoniais, as culturas de esplenócitos apresentaram comportamento semelhante, mantendo o mesmo padrão de produção de NO.

No 5º dia de experimento, aparentemente, não há diferenças relevantes nos níveis produção de NO para nenhum dos grupo.

Para o 9º dia de experimento os grupos Sham, ADX e A+D (não-infectados e infectados) tiveram uma elevação nos níveis de NO. Porém, estatisticamente eles não diferem.

Já no 14º dia de experimento, o grupo A+D apresentou aumento nos níveis de NO, porém como os demais grupos os dados não foram significativos.

Dessa forma, pode-se concluir que a adrenalectomia não modificou a evolução da resposta imune na tripanosomíase experimental. Todos os animais conseguiram controlar a parasitemia. Pode-se inferir, que a reposição de dexametasona e a adrenalectomia não se constituíram em fatores decisivos para um redirecionamento da resposta imune, mesmo que estes grupos tenham apresentados as maiores alterações.

6. Capítulo III

A influência da adrenalectomia em órgãos de ratos *Wistar* machos infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

6.1. Resumo

A doença de Chagas é causada por um parasita intracelular - *Trypanosoma cruzi*, que provoca distintas patogenias com diferentes sintomatologias, dependendo do tipo de cepa e de seu tropismo, acometendo vários órgãos, sendo mais freqüentes o coração, baço, fígado, intestino e esôfago.

O presente trabalho avalia as alterações histopatológicas do coração, baço, fígado e timo, de ratos *Wistar* machos, infectados ou não com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, que sofreram adrenalectomia com ou sem reposição de dexametasona, comparados com os grupos Controle e Sham. A análise da parasitemia e do parasitismo tecidual, foram realizados no 5º, 9º, 14º e 23º dias após o inóculo. Já a cariometria foi analisada no 9º dia de infecção, que corresponde ao pico parasitêmico.

Observou-se maior parasitemia nos animais do grupo adrenalectomizado quando comparados aos demais; e o grupo adrenalectomizado com reposição de dexametasona apresentou os menores níveis parasitêmicos.

No parasitismo tecidual constatou-se que dentre todos os órgãos, somente o coração obteve grande quantidade de ninhos de amastigotas, principalmente no 9º dia de infecção. Porém, não foram encontrados ninhos de amastigota nos demais órgãos. A cariometria apresentou alterações significativas, dependendo do tipo de órgão e dos grupos que foram comparados.

6.2 Introdução

Descrita em 1909, por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909), a Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, sendo endêmica em 21 países das Américas do Sul e Central, onde cerca de 16 a 18 milhões de pessoas apresentam a forma crônica de infecção, o que representa um grande impacto social e econômico (WHO, 2000). Sua incidência encontra-se condicionada ao nível econômico e social da região e, em particular, à existência de vetores domiciliários, aos tipos precários de habitação do homem rural e às baixas condições de higiene de seus habitantes.

ANDRADE et al. (1970), relatam a existência de cepas com predominância de formas delgadas, como a cepa Y, que possui multiplicação rápida e picos parasitêmicos precoces, determinando alta mortalidade em camundongos e tropismo tecidual diferenciado para as células do sistema fagocitário mononuclear, parasitando com frequência esplenócitos, hepatócitos e medula óssea, causando lesões tissulares graves.

As alterações podem ser verificadas em modelos experimentais, como em ratos *Wistar*, podendo reproduzir nos mesmos, os distintos aspectos patológicos da doença humana.

Estas modificações no organismo do hospedeiro se relacionam com os Sistemas Nervoso e Endócrino, através do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), que também influencia o Sistema Imune (SI).

As alterações histopatológicas dependem do tropismo da cepa e, conseqüentemente, do maior grau de parasitismo dos diferentes setores do organismo

(ANDRADE et al., 1970; ANDRADE et al., 1974). Porém, a grande maioria das cepas provoca na fase aguda da doença uma esplenomegalia de dimensões variáveis de acordo com a magnitude da resposta imune (BRENER et al., 2000). Além disso, a presença de infiltrado mononuclear, congestão aguda e edema podem ser encontrados nas secções histológicas de quase todos os órgãos acometidos (BRENER et al., 2000; KIERSZENBAUM, 1996).

Dentre estes órgãos atingidos, o baço, considerado como um órgão linfóide, é composto por uma polpa branca e uma vermelha. Este órgão possui funções múltiplas como: intervir nos mecanismos de defesa do organismo, maturação de linfócitos e indiretamente produção de anticorpos. Tem ainda como funções a destruição dos glóbulos vermelhos senescentes, sendo capaz de renovar a atividade hemocitopoética da medula, quando esta está diminuída (MOORE, 1992).

O timo é outro órgão linfóide, localizado na parte superior do mediastino anterior. O amadurecimento do timo varia conforme a espécie, e no caso de camundongos só completa seu desenvolvimento no período pós-natal. Porém, o timo sofre involução com o tempo, e no caso de camundongos começa seu decréscimo na sexta semana de vida de modo progressivo, diminuindo a quantidade de CD4, CD8 e CD3, provavelmente devido à presença dos hormônios sexuais (LEITE DE MORAES et al, 1992, JANEWAY, 2000).

O timo é separado por septos conjuntivos que servem de suporte aos vasos, delimitando os lóbulos. Estes compreendem uma parte periférica, rica em linfócitos – chamada de córtex, e uma parte menos rica em linfócitos e de coloração mais clara – denominada de medula (BACH, 1982, ROITT, et al., 1996).

Na região do córtex ocorrem divisão e penetração das células primitivas (linfócitos), promovendo várias mitoses, além de estocar os pequenos linfócitos. Já na zona medular encontram-se os linfócitos mais maduros (ABBAS et al, 2000).

Admite-se através de muitos trabalhos, que os linfócitos corticais (sensíveis aos corticosteróides) e os linfócitos medulares (resistentes) representam duas populações de desenvolvimento independentes. Estas são capazes de migrar para os órgãos linfóides periféricos, onde originam sub-populações de células T distintas (BACH, 1982). Estes linfócitos realizam a imunidade celular, sendo estes, importante para a proteção à infecção de *T.cruzi*. A depleção de células T CD4⁺, como de T CD8⁺, aumentam a suscetibilidade de animais à infecção, induzindo maiores níveis de parasitemia e mortalidade (RUSSO, et al., 1988, TARLETON, 1990).

A ação imunossupressora já era percebida a inúmeras décadas em numerosos animais de laboratório. DOUGHERTY e WHITE, (1944, 1947), descreveram que os glicocorticóides ocasionam uma rápida lise do tecido linfático, especialmente nas células do timo. A presença de uma proteína receptora de glicocorticóides no timo do rato sugere que estes efeitos são mediados por uma interação entre um complexo esteróide-receptor e a cromatina do núcleo. As alterações precoces nas funções bioquímicas no timo, provocadas pelos glicocorticóides incluem: redução do transporte de aminoácidos, nucleotídeos e íons e utilização reduzida da glicose, síntese de RNA e fosforilação.

Quando os animais sofrem uma adrenalectomia, e quando se administra doses de glicocorticóide como a dexametasona, torna-se aparente a dissolução dos linfócitos no tecido linfóide. Os núcleos tornam-se picnóticos e se desintegram, ou as

células podem desprender-se de seu citoplasma. O resto celular é fagocitado (GOODMAN, 1983).

A inflamação é o processo patológico básico da doença de Chagas. Ocorrem dois tipos de reação inflamatória associada a *T.cruzi*: a reação focal, parasito-dependente, que surge onde quer que o parasita se multiplique, causando ruptura da célula parasitária; e uma reação difusa que ocorre apenas no miocárdio durante as fases aguda e crônica cardíaca da infecção.

Dependendo da intensidade do parasitismo, a reação que se forma em torno da célula parasitada pode se intensificar e confluir, atingindo áreas mais ou menos extensas (BRENER et al., 2000).

O coração é um dos órgãos mais atingidos por *T.cruzi*, diante do desenvolvimento da doença de Chagas. Em humanos, mesmo aqueles que em vida mostraram apenas sinais escassos de envolvimento cardíaco, apresentavam a miocardia (ANDRADE, et al., 1978).

Pode-se verificar neste órgão, acentuadas lesões inflamatórias, tanto na fase aguda como crônica, variando de grau leve, moderado e intenso, e parasitismo cardíaco. Porém, inóculos baixos não determina lesões ou quando presentes são de grau leve (BRENER et al., 2000).

As principais patogenias são as lesões de ponta do ventrículo esquerdo e as lesões fibróticas degenerativas, podendo levar um espessamento da parede do endocárdio, com formação dos aneurismas de ponta (OLIVEIRA et al, 1981; MADY & NACRUTH, 1995).

O acometimento do fígado na doença de Chagas foi comprovado tanto em humanos como em modelos experimentais, onde a carga parasitária dependeria da cepa de *T. cruzi* (NUNES, et al., 1992).

ALMENARA (1920) e PINHEIRO-CHAGAS (1920), descreveram as principais alterações histopatológicas decorrentes da agressão hepática por *T. cruzi*, caracterizadas por infiltração gordurosa, hipertrofia das células de Kupffer, áreas de necrose e infiltração linfomonocitária dos capilares intralobulares ou periportais. Porém, em modelos experimentais, como em camundongos, o parasitismo hepático é escasso (ALVARENGA, 1960; BRENER et al., 2000).

Estudos sugerem que as lesões de natureza inflamatória e degenerativa da fase aguda não apresentam caráter evolutivo, e que as funções hepáticas se encontram pouco alteradas na fase crônica da doença de Chagas (BRENER et al., 2000).

Diante destas premissas citadas, o presente trabalho verificou as possíveis alterações histopatológicas em órgãos como: baço, timo, coração e fígado, juntamente com seu parasitismo tecidual, em animais infectados ou não com a cepa Y de *T. cruzi*, que foram submetidos a adrenalectomia com e sem reposição de dexametasona em comparação com os grupos controle e sham, nos dias pré-determinados de experimentação. As análises foram verificadas por cariometria.

6.3 Material e Métodos

6.3.1 Animais utilizados

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar*, jovens, pesando entre 100 e 110 gr, provenientes de uma colônia mantida no biotério da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Esses animais foram ambientados no biotério da FCFRP-USP, sendo mantidos a uma temperatura ambiente de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, num ciclo claro/escuro 12/12 horas com a água e ração da marca Nuvilab *ad libitum*. Estes animais são apropriados para o trabalho porque, seu tamanho maior permite melhor visualização das glândulas adrenais, e também, por sobreviverem um período de tempo maior, mesmo estando infectados.

6.3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos e identificados como:

Grupo Controle:

CNI - Animais não operados e não infectados (n = 5)

SHNI – Animais sham não infectados (n = 5)

ADXNI – Animais Adrenalectomizados não infectado (n = 5)

A+DNI – Animais Adrenalectomizados não infectado com reposição de dexametasona (n = 5)

Grupo Infectado:

CI – Animais não operados, infectados com *T.cruzi* (n = 5)

SHI – Animais sham infectados com *T.cruzi* (n = 5)

ADX1 – Animais Adrenalectomizados infectados com *T.cruzi* (n = 5)

A+DI – Animais Adrenalectomizados infectados com *T.cruzi* e com reposição de dexametasona (n = 5)

Foi utilizado um total de 20 animais por dia de experimento.

6.3.3 Dias de experimento

Os experimentos foram realizados em dias pré-determinados, após a infecção: na fase inicial da doença (5º.), no pico da parasitemia (9º.), na fase descendente (14º.) e no início da fase indeterminada (23º.). Estes dias foram escolhidos baseados na curva parasitêmica, onde o pico ocorre entre o 9º. e 12º. após o inóculo. Para cada dia de experimento, foram sacrificados 5 animais de cada grupo.

6.3.4 Parasitas

Utilizou-se a cepa Y de *T.cruzi*, isolada por SILVA & NUSSENZWEIG (1953), através de xenodiagnóstico realizado em uma paciente na fase aguda da infecção chagásica. Desde então, vem sendo mantida em camundongos *Swiss* heterogênicos, por meio de repiques semanais no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

Trata-se de uma cepa com predominância de formas delgadas, multiplicação rápida e picos parasitêmicos precoces, determinando alta mortalidade em camundongos e tropismo tecidual preferencialmente para as células do sistema fagocitário mononuclear, parasitando com frequência esplenócitos, hepatócitos e medula óssea (ANDRADE, 1976), causando lesões tissulares graves.

6.3.5 Adrenalectomia

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de Tribromoetanol (TBE) a 2,5% (0,025g/ml), diluído em NaCl 0,15M, sendo injetado 1ml a cada 100g de peso corporal. A incisão foi feita na pele e tecido subcutâneo na linha média, tendo como referência o ângulo entre a última costela e a coluna vertebral. Após a visualização dos órgãos abdominais, com uma pinça sem dentes, foi pinçada a gordura peri-renal abaixo da adrenal, removendo as glândulas adrenais. Após o ato cirúrgico, os animais foram colocados em caixas estéreis, com maravalha e ração, sendo imediatamente aplicada uma injeção de pentabiótico (0,1ml/kg), com o intuito de prevenir possíveis infecções bacterianas. Os animais receberam a água filtrada, ração e salina hipertônica 2% *ad libitum*, juntamente com antibiótico (Amoxilina), diluído em água no volume de 0,75ml para cada animal durante 5 dias.

6.3.6 Adrenalectomia fictícia (Sham)

Os animais foram anestesiados e operados da mesma maneira anteriormente descrita, porém, sem a retirada das glândulas adrenais.

Após a cirurgia, a posterior manutenção dos animais foi realizada nas mesmas condições do grupo adrenalectomizado, exceto com relação a salina hipertônica 2%, que não foi ministrada a esse grupo.

6.3.7 Infecção ou simulação

Decorridos cinco dias após o ato cirúrgico, os animais do Grupo Infectado foram inoculados i.p. 1×10^5 tripomastigotas sangüícolas. A contagem dos parasitos foi

feita pelo Método de BRENER (1962), que consiste em colocar uma alíquota de 5 μ l de sangue infectado em uma lâmina de microscópio, cobrindo-o com lamínula 22x22mm, determinando assim o número de parasitos em 50 campos. O número encontrado foi multiplicado pelo fator do microscópio, calculado para cada objetiva, levando em consideração o número de campos microscópios existentes na área da lamínula. O ajuste final do número de parasitos foi feito através da diluição do sangue em NaCl 0,15M.

No Grupo Controle foi simulada a infecção com a inoculação i.p. de 0,1ml de NaCl 0,15M para induzir o mesmo estresse do grupo infectado.

6.3.8 Reposição de dexametasona

A reposição de dexametasona foi feita mediante a administração intramuscular deste corticóide sintético na dose de 0,4mg/Kg 24 horas, diluída em solução fisiológica 0,9% e realizada por volta das 17:00 horas, durante o período experimental (WING et al., 1993).

A periodicidade da reposição hormonal, foi diária, até atingir os períodos dos experimentos: 5^o, 9^o, 14^o e 23^o dias.

6.3.9 Eutanasia

Os animais foram eutanasiados por decapitação, no sentido de minimizar ao máximo o estresse, e conseqüentemente, prevenir a liberação de altos níveis de corticóides (TUFFERY, 1987).

6.3.10 Exame histopatológico

Em cada ponto após a infecção, foram coletados os seguintes órgãos: baço, fígado, coração e timo. Os órgãos foram pesados em balança eletrônica (Mettler H10W), lavados em solução de NaCl 0,15M, fixados em ALFAC e após 24 horas, colocados em solução de álcool 80%, para o processamento histológico. Confeccionou-se cortes histológicos de 6 μ m que foram corados por Hematoxilina-Eosina, e examinados em microscópio óptico comum com aumento de 100x (imersão) (MELO & BRENER, 1978).

Os tecidos coletados e processados dos animais de cada grupo, foram destinados às medidas morfométricas.

6.3.11 Intensidade do parasitismo tecidual

O grau de parasitismo foi estimado através da análise qualitativa, a partir da determinação do número de ninhos observados em 50 campos microscópicos (400X). Para essa análise, foram utilizados materiais de cinco animais de cada grupo em estudo (CASTRO & BRENER, 1985; GONÇALVES NETO, 2002). Considerou-se como (++++), os cortes em que de 50 a 100% dos campos apresentarem-se parasitados, (+++) cortes onde forem encontrados ninhos de amastigotas em 25 a 50% dos campos, (++) quando forem encontrados menos de 12,5% dos campos parasitados e (-) para ausência de ninhos de amastigotas (CASTRO e BRENER, 1985).

6.3.12 Técnica morfométrica (Cariometria)

Com a finalidade de avaliar as alterações nucleares das fibras cardíacas e das células dos órgãos, devido a ausência do hormônio frente a presença do parasita, dos diferentes grupos estudados no dia de pico da parasitemia (9º dia), foram determinados os diâmetros maiores (D) e menores (d) desses núcleos. Os cortes foram focalizados em microscópio acoplado a um computador com sistema de captura de imagem, contornando 50 núcleos por corte em um total de 250/animal, com aumento final de 1000X. Posteriormente foram medidos os diâmetros maiores (D) e os menores (d) dos núcleos. Os dados obtidos foram analisados por meio de um programa para computador desenvolvido pelo Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. Foram avaliados os seguintes parâmetros nucleares: diâmetro médio, perímetro, relação entre diâmetros, volume, área, coeficiente de forma, índice de contorno e excentricidade (SALA et al., 1994).

6.3.13 Métodos estatísticos

A comparação entre os grupos foi feita por meio dos testes de análise de variância – ANOVA. Para análise dos resultados, assim como para os distintos cálculos matemáticos envolvidos nos estudos morfométricos, foi utilizado programas para computador IBM-PC, em linguagem BASIC AVANÇADO (BÁSICA) desenvolvidos no Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, visando o processamento dos dados experimentais. Utilizou-se o teste não paramétrico de Kurskall Wallis (SIEGEL, 1975). Os resultados foram expressos pela

média (\pm erro padrão da média) e considerados estatisticamente significativos para um $p \leq 0,05$.

6.4 Resultados e Discussão

6.4.1 Parasitemia

Os resultados obtidos ilustrados na Figura 1, representa a curva parasitêmica de ratos *Wistar* machos, infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* dos grupos controle (C), sham (SH), adrenalectomizados (ADX) e adrenalectomizados com reposição de dexametasona (A+D). Todos os grupos apresentaram pico parasitêmico no 9º dia de infecção.

Porém, o grupo ADX teve valores significativamente mais elevados de parasitas, em comparação aos demais grupos. Já o grupo A+D mostrou um decréscimo da parasitemia.

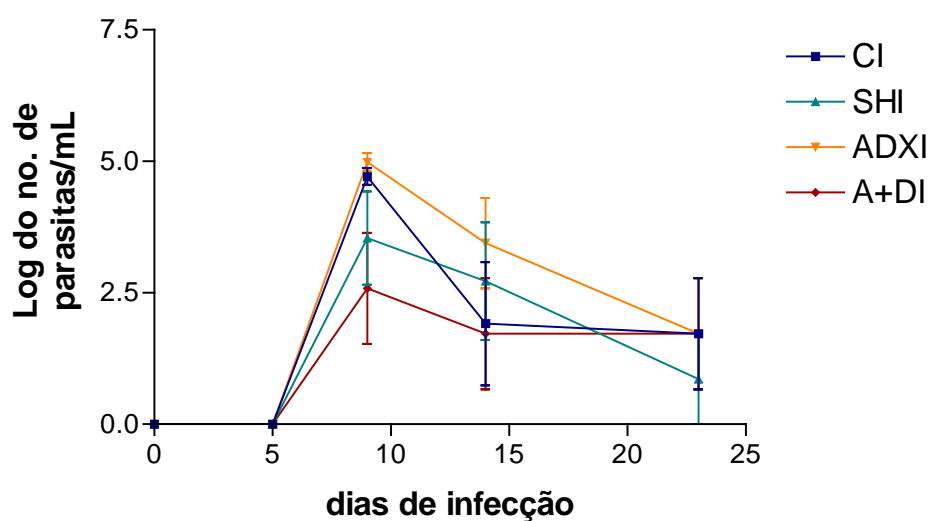


Figura 1. Evolução da parasitemia em ratos *Wistar* machos infectados com 1×10^5 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Grupos controle infectado (CI), Sham infectado (SHI), Adrenalectomizado infectado (ADX) e Adrenalectomizado com reposição de dexametasona infectado (A+DI).

Com os dados apresentados no gráfico (Figura1), verificou-se que o pico de parasitemia manteve-se constante no 9º dia após o inóculo, para os quatro grupos experimentais (controle, sham, adrenalectomizado e adrenalectomizado com reposição de dexametasona).

O perfil da curva parasitêmica do grupo Controle apresentou-se um pouco maior que o grupo Sham, porém estatisticamente não significativo. Isso ocorre porque no grupo Sham o ato cirúrgico é um estímulo estressor, podendo levar o animal a um estado de imunossupressão, e conseqüentemente, debilitando as funções fisiológicas, aumentando assim, a parasitemia.

Pode-se observar que a parasitemia do grupo ADXI apresentou o maior nível de parasitas quando comparado aos demais. Isto leva a crer que o ato cirúrgico, bem como a retirada dos hormônios corticóides do organismo, proporcionou um agravamento da parasitemia.

O grupo A+DI apresentou o menor nível de parasitemia dentre os grupos. Este grupo sofreu o estresse da retirada das glândulas adrenais e posteriormente foi fornecido dexametasona, um glicocorticóide sintático, para suprir a falta deste hormônio. Deve-se ter em mente que esta substância é imunossupressora, mas alguns autores como FANTUZZI, et al., (1994), demonstram que suas ações podem ser ambíguas, dependendo do tipo de tratamento, de modo que, as quantidades liberadas de corticosterona atenuam o contingente inflamatório, levando os animais a uma reação de adaptação ao parasitismo, o que pode ser refletido pela menor parasitemia encontrada no grupo A+DI.

6.4.2 Parasitismo Tecidual

6.4.2.1 Coração

Análise qualitativa da intensidade do parasitismo tecidual nas fibras cardíacas de ratos *Wistar* machos, pode ser avaliada, analisando os valores da tabela abaixo.

Tabela 1. Análise qualitativa da intensidade do parasitismo tecidual nas fibras cardíacas de ratos *Wistar* machos infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T.cruzi* nos diferentes dias de experimento (CI = controle infectado, SHI = sham infectado, ADXI = adrenalectomizados infectados e A+DI = adrenalectomizados com reposição de dexametasona infectado).

Grupo experimental	nº de animais	Dias de experimento			
		5º	9º	14º	23º
CI	5	(-)	(++++)	(+)	(-)
SHI	5	(-)	(++)	(+)	(-)
ADXI	5	(-)	(+++)	(-)	(-)
A+DI	5	(-)	(+++)	(-)	(-)

6.4.2.2 Fígado

Avaliação da intensidade do parasitismo tecidual no fígado de ratos *Wistar* machos, infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi*.

Tabela 2. Análise qualitativa da intensidade do parasitismo tecidual no fígado de ratos *Wistar* machos infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* nos diferentes dias de experimento (CI = controle infectado, SHI = sham infectado, ADXI = adrenalectomizados infectados e A+DI = adrenalectomizados com reposição de dexametasona infectado).

Grupo experimental	nº de animais	Dias de experimento			
		5º	9º	14º	23º
CI	5	(-)	(-)	(-)	(-)
SHI	5	(-)	(-)	(-)	(-)
ADXI	5	(-)	(-)	(-)	(-)
A+DI	5	(-)	(-)	(-)	(-)

6.4.2.3 Baço

Análise qualitativa da intensidade do parasitismo tecidual no baço de ratos *Wistar* machos, infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T.cruzi* pode ser avaliada, analisando os valores da tabela abaixo.

Tabela 3. Análise qualitativa da intensidade do parasitismo tecidual no baço de ratos *Wistar* machos infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T.cruzi* nos diferentes dias de experimento (CI = controle infectado, SHI = sham infectado, ADXI = adrenalectomizados infectados e A+DI = adrenalectomizados com reposição de dexametasona infectado).

Grupo experimental	nº de animais	Dias de experimento			
		5º	9º	14º	23º
CI	5	(-)	(-)	(-)	(-)
SHI	5	(-)	(-)	(-)	(-)
ADXI	5	(-)	(-)	(-)	(-)
A +DI	5	(-)	(-)	(-)	(-)

6.4.2.4 Timo

Avaliação da intensidade do parasitismo tecidual no timo de ratos *Wistar* machos, infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi*.

Tabela 4. Análise qualitativa da intensidade do parasitismo tecidual no timo de ratos *Wistar* machos infectados com 1×10^5 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* nos diferentes dias de experimento (CI = controle infectado, SHI = sham infectado, ADXI = adrenalectomizados infectados e A+DI = adrenalectomizados com reposição de dexametasona infectado).

Grupo experimental	nº de animais	Dias de experimento			
		5º	9º	14º	23º
CI	5	(-)	(-)	(-)	(-)
SHI	5	(-)	(-)	(-)	(-)
ADX1	5	(-)	(-)	(-)	(-)
A+DI	5	(-)	(-)	(-)	(-)

A análise histopatológica dos órgãos em questão revelou presença de ninhos de amastigotas, somente no coração. Isto pode ser explicado por várias razões. De acordo com VICHÍ (1964), a cepa Y determina infecção grave em ratos *Wistar* de 25 a 50 g., com alta mortalidade entre o 10^o e o 25^o dia, lesões no miocárdio, com intensa miocardite para alguns. Em ratos *Wistar* de 40 dias, inoculados com a mesma cepa (Y), SCORZA e SCORZA (1972), observaram miocardite de grande intensidade, que atingiu o máximo aos 18 dias de infecção, porém os animais não morreram espontaneamente atingindo até mais de 30 dias após o inóculo. CHAPADEIRO et al. (1988), estudando a histopatologia com duas cepas de *T.cruzi* Y e 12SF, verificaram a importância do inóculo na produção das lesões: inóculos baixos não determinam lesões significantes e se existirem, é de grau leve.

Não se pode dizer que 1×10^5 formas é um inóculo baixo, principalmente se considerar que nos animais utilizados no experimento, todos tinham ao redor de 50 dias de idade e com peso aproximado compreendido entre 100 e 110g. Como esta espécie é heterogênea, a variação individual da resposta imune também é distinta. Devido a adrenalectomia, a reposição de salina se faz necessária para suprir a ausência do hormônio mineralocorticoide, também produzida por esta glândula. Desta forma mesmo com a reposição diária de salina, os animais não sobrevivem por um período maior que 25 dias, motivo pelo qual se optou pelo estudo na fase aguda da doença. Como o pico de parasitemia ocorre no 9^o dia após o inóculo, e os animais já estão mais velhos, com maior peso e, conseqüentemente, com uma resposta imune mais efetiva.

O encontro de ninhos no 9^o dia após o inóculo pode perfeitamente ser explicado baseado nos dados acima expostos. Possivelmente se os animais fossem

mais jovens, ou se o inóculo fosse em quantidade maior, o encontro de ninhos de amastigotas seria mais freqüente.

Para os demais órgãos estudados, não foram observados ninhos de amastigotas, devido ao fato que o 5º dia ser a fase inicial da infecção, cuja visualização é pouco freqüente para ratos. Já os 14º e 23º dias também não foram encontrados ninhos, porém os amastigotas podem estar nos tecidos, soltos, sendo detectados somente por imunohistoquímica.

6.4.3 Análise Cariométrica

6.4.3.1 Coração

Os valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do coração de ratos *Wistar* machos dos grupos estudados durante o 9º dia da infecção, demonstraram nas tabelas abaixo uma comparação entre os grupos: controle (C), sham (SH), adrenalectomizados (ADX) e adrenalectomizados com reposição dexametasona (A+D). Por meio dos resultados da curva parasitêmica o pico de parasitemia foi ao redor do 9º dia coincidindo com o pico de alterações teciduais, motivo pelo qual foi realizada a cariometria nesse dia.

Tabela 5. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **coração** de ratos *Wistar* machos do grupo controle, comparado com os demais grupos estudados, durante o 9º dia de experimento sem infecção. Controle (CNI), Sham (SHNI), adrenalectomizados (ADXNI) e adrenalectomia com reposição de dexametasona (A+DNI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ *** $p < 0,001$, *ns* = não significativo).

Parâmetros	Grupos experimentais			
	CNI	SHNI	ADXNI	A+DNI
Diâmetro maior (μm)	11.92	9.69***	11.22*	10.64***
Diâmetro menor (μm)	5.30	4.97*	4.57***	5.03*
Diâmetro médio (μm)	7.89	6.88***	7.07***	7.27***
Relação entre diâmetros	2.35	2.03***	2.61**	2.16**
Volume nuclear (μm^3)	277.73	188.55***	203.39***	211.59***
Perímetro (μm)	28.18	38.55***	26.10***	25.51***
Área nuclear (μm^3)	50.28	40.59***	40.62***	42.22***
Relação volume/superfície	5.26	4.59***	4.72***	4.85***
Excentricidade	0.88	0.83***	0.89**	0.86**
Índice de contorno	4.05	3.90***	4.17**	3.96**
Coeficiente de Forma	0.78	0.84***	0.74**	0.81**

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

Analisando os dados, observou-se que os grupos estudados apresentaram uma atrofia nuclear significativa em relação ao controle, demonstrando que o ato cirúrgico e a ausência dos hormônios ocasionam um estresse suficiente, para alterar as conformações nucleares das células cardíacas.

Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do coração de ratos *Wistar* machos realizados no 9º dia de experimento. Na tabela abaixo, são comparados os dados o grupo controle infectado com os demais grupos infectados, coincidindo com o dia do pico parasitário.

Tabela 6. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **coração** de ratos *Wistar* machos do grupo controle comparado com os demais grupos estudados durante o 9º dia de experimento com infecção. Controle (CI), sham (SHI), adrenalectomizados (ADXl) e adrenalectomia com reposição de dexametasona (A+DI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *ns* = não significativo).

Parâmetros	Grupos experimentais			
	CI	SHI	ADXl	A+DI
Diâmetro maior (μm)	8.41	11.97***	9.73***	10.51***
Diâmetro menor (μm)	4.25	4.78 ^{ns}	4.55*	4.67***
Diâmetro médio (μm)	5.95	7.41***	6.60***	6.95***
Relação entre diâmetros	2.01	2.63***	2.19*	2.33***
Volume nuclear (μm^3)	116.35	243.82***	159.20***	185.74***
Perímetro (μm)	20.47	27.82***	23.27***	24.85***
Área nuclear (μm^3)	28.31	44.75***	34.88***	38.63***
Relação volume/superfície	3.97	4.94***	4.40***	4.63***
Excentricidade	0.85	0.89***	0.86*	0.87***
Índice de contorno	3.88	4.18***	3.97*	4.04***
Coeficiente de Forma	0.84	0.75***	0.81*	0.78***

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

Analisando a tabela 6, verificou-se que as maiores alterações tanto na forma quanto no tamanho nuclear, foram mais significativas para o grupo A+DI, sugerindo que a infecção associada a adrenalectomia mais a reposição de glicocorticóide sintético provocaram uma atrofia nuclear mais predominante neste grupo. Os demais, também apresentaram alterações nucleares, porém de menor intensidade.

Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do coração de ratos *Wistar* machos estudados, foram realizados durante o 9º dia de experimento. Na tabela abaixo são comparados os dados o grupo Sham não infectado (SHNI), com os grupos adrenalectomizado (ADX) e adrenalectomizado com dexametasona (A+D) não-infectado e infectado, coincidindo com o dia do pico parasitêmico.

Tabela 7. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **coração** de ratos *Wistar* machos do grupo sham não infectado (SHNI) comparado com os grupos adrenalectomizados (ADX) e adrenalectomizados com dexametasona (A+D) não infectado e infectado durante o 9º dia de experimento. Sham (SHNI), adrenalectomizados (ADXNI e ADXI) e adrenalectomizados com reposição dexametasona (A+DNI e A+DI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *ns* = não significativo).

Parâmetros	SHNI	ADXNI	A+DNI	ADXI	A+DI
Diâmetro maior (μm)	9.69	11.22***	10.64***	9.73 ^{ns}	10.51***
Diâmetro menor (μm)	4.97	4.57***	5.03 ^{ns}	4.55***	4.67***
Diâmetro médio (μm)	6.88	7.07 ^{ns}	7.27*	6.60*	6.95 ^{ns}
Relação entre diâmetros	2.03	2.61*	2.16***	2.19***	2.33 ^{ns}
Volume nuclear (μm^3)	188.55	203.39*	211.59***	159.20 ^{ns}	185.74 ^{ns}
Perímetro (μm)	38.55	26.10***	25.51***	23.27**	24.85 ^{ns}
Área nuclear (μm^3)	4.59	40.62 ^{ns}	42.22*	34.88*	38.63 ^{ns}
Relação volume/superfície	4.59	4.72*	4.85***	4.40 ^{ns}	4.63 ^{ns}
Excentricidade	0.83	0.89***	0.86*	0.86***	0.87***
Índice de contorno	3.90	4.17*	3.96 ^{ns}	3.97***	4.04***
Coeficiente de Forma	0.84	0.74***	0.81*	0.81***	0.78***

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

Com o intuito de verificar se o estresse da cirurgia, mais a adrenalectomia com ou sem reposição de glicocorticóides e mais a infecção, ocasiona-se alterações nos núcleos das células, pôde-se constatar mediante os resultados, uma diminuição significativa do tamanho nuclear com tendência a forma eliptóide, principalmente para os grupos infectados.

Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do coração de ratos *Wistar* machos estudados, foram realizados durante o 9º dia de experimento. Na tabela abaixo são comparados os dados o grupo Sham infectado (SHI), com os grupos ADX e A+D não-infectado e infectado, coincidindo com o dia do pico parasitêmico.

Tabela 8. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **coração** de ratos *Wistar* machos do grupo Sham infectado (SHI) comparado com os grupos ADX e A+D não infectado e infectado durante o 9º dia de experimento. Sham (SHI), adrenalectomizados (ADXNI e ADXI) e adrenalectomizados com reposição dexametasona (A+DNI e A+DI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *ns* = não significativo).

Parâmetros	Grupos experimentais				
	SHI	ADXNI	A+DNI	ADXI	A+DI
Diâmetro maior (μm)	11.97	11.22***	10.64***	9.73 ***	10.51***
Diâmetro menor (μm)	4.78	4.57 **	5.03 ***	4.55 ^{ns}	4.67*
Diâmetro médio (μm)	7.41	7.07 ***	7.27***	6.60***	6.95 ***
Relação entre diâmetros	2.63	2.61***	2.16***	2.19***	2.33 ^{ns}
Volume nuclear (μm^3)	243.82	203.39 ***	211.59 ***	159.20 ***	185.74 ***
Perímetro (μm)	27.82	26.10***	25.51***	23.27***	24.85 ***
Área nuclear (μm^3)	44.75	40.62 ***	42.22***	34.88***	38.63 ***
Relação volume/superfície	4.94	4.72***	4.85***	4.40 ***	4.63 ***
Excentricidade	0.89	0.89***	0.86***	0.86***	0.87***
Índice de contorno	4.18	4.17***	3.96 ***	3.97***	4.04***
Coeficiente de Forma	0.75	0.74***	0.81***	0.81***	0.78***

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

De forma geral, ao comparar o grupo SHI com os demais, notou-se uma redução nuclear, tanto na forma quanto ao tamanho, para todos os grupos, indicando que a infecção provocada pelo parasita foi importante para a alteração dos núcleos.

6.4.3.2 Baço

Parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do baço de ratos *Wistar* machos durante o 9º dia de infecção, demonstraram na tabela abaixo a comparação do grupo controle com os demais (Sham, ADX e A+D) não infectados.

Tabela 9. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **baço** de ratos *Wistar* machos do grupo Controle, comparado com os demais grupos estudados (Sham, ADX e A+D) sem infecção, durante o 9º dia de experimento. Controle (CNI), Sham (SHNI), adrenalectomizados (ADXNI) e adrenalectomizados com dexametasona (A+DNI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ns = não significativo).

Parâmetros	Grupos experimentais			
	CNI	SHNI	ADXNI	A+DNI
Diâmetro maior (μm)	6.15	5.67***	5.38***	5.93**
Diâmetro menor (μm)	4.62	4.25***	4.09***	4.51 ^{ns}
Diâmetro médio (μm)	5.31	4.90***	4.69***	5.17***
Relação entre diâmetros	1.36	1.35 ^{ns}	1.33 ^{ns}	1.33 ^{ns}
Volume nuclear (μm^3)	84.97	65.25***	57.62***	77.45 ^{ns}
Perímetro (μm)	17.01	15.67***	14.96***	16.50 ^{ns}
Área nuclear (μm^3)	22.76	19.21***	17.64***	21.45 ^{ns}
Relação volume/superfície	3.54	3.27***	3.13***	3.44 ^{ns}
Excentricidade	0.64	0.64 ^{ns}	0.64 ^{ns}	0.63 ^{ns}
Índice de contorno	3.62	3.61 ^{ns}	3.60 ^{ns}	3.60 ^{ns}
Coeficiente de Forma	0.96	0.96 ^{ns}	0.97 ^{ns}	0.97 ^{ns}

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

Analisando os esplenócitos, verificou-se que os grupos SHNI e ADXNI apresentaram atrofia dos núcleos, sendo significativa, quando comparados ao grupo CNI, porém a morfologia nuclear quanto à forma, não apresentou alterações para nenhum dos grupos estudados.

Parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do baço de ratos *Wistar* machos durante o 9º dia de infecção, demonstraram na tabela abaixo uma comparação do grupo controle com os demais grupos infectados (Sham, ADX e A+D). Este dia coincide com o pico parasitário.

Tabela 10. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **baço** de ratos *Wistar* machos do grupo controle, comparado com os demais grupos estudados (Sham, ADX e A+D) com infecção, durante o 9º dia de experimento. Controle (CI), Sham (SHI), adrenalectomizados (ADX) e adrenalectomizados com dexametasona (A+DI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *ns* = não significativo).

Parâmetros	Grupos experimentais			
	CI	SHI	ADX	A+DI
Diâmetro maior (μm)	5.00	5.85***	5.77***	5.71***
Diâmetro menor (μm)	3.59	4.39***	4.45***	4.32***
Diâmetro médio (μm)	4.23	5.06***	5.06***	4.96***
Relação entre diâmetros	1.41	1.34**	1.31***	1.33*
Volume nuclear (μm^3)	40.81	72.58***	71.54***	69.86***
Perímetro (μm)	13.61	16.18***	16.14***	15.84***
Área nuclear (μm^3)	14.18	20.56***	20.48***	19.91***
Relação volume/superfície	2.82	3.37***	3.38***	3.31***
Excentricidade	0.67	0.64**	0.62***	0.64*
Índice de contorno	3.63	3.61**	3.60***	3.61*
Coeficiente de Forma	0.95	0.97**	0.97***	0.97*

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

Ao compararmos o grupo controle infectado com os demais, observou-se que o grupo ADXI apresentou as alterações mais relevantes, acompanhada de atrofia nuclear.

Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do baço de ratos *Wistar* machos durante o 9º dia de experimento. Na tabela abaixo são comparados os dados do grupo Sham não infectado, com os grupos ADX e A+D não infectado e infectado, coincidindo com o dia do pico parasitêmico.

Tabela 11. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **baço** de ratos *Wistar* machos do grupo sham não infectado comparado com os grupos ADX e A+D não infectado e infectado durante o 9º dia de experimento. Sham (SHNI), adrenalectomizados (ADXNI e ADXI) e adrenalectomizados com dexametasona (A+DNI e A+DI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *ns* = não significativo).

Parâmetros	Grupos experimentais				
	SHNI	ADXNI	A+DNI	ADXNI	A+DI
Diâmetro maior (μm)	9.69	11.22*	10.64*	9.73 ^{ns}	10.51 ^{ns}
Diâmetro menor (μm)	4.97	4.57**	5.03***	4.55*	4.67 ^{ns}
Diâmetro médio (μm)	6.88	7.07***	7.27***	6.60 ^{ns}	6.95**
Relação entre diâmetros	2.03	2.61*	2.16***	2.19***	2.33 ^{ns}
Volume nuclear (μm^3)	188.55	203.39*	211.59***	159.20 ^{ns}	185.74***
Perímetro (μm)	38.55	26.10*	25.51***	23.27 ^{ns}	24.85***
Área nuclear (μm^3)	40.59	40.62*	42.22*	34.88**	38.63 ^{ns}
Relação volume/superfície	4.59	4.72*	4.85***	4.40 ^{ns}	4.63***
Excentricidade	0.83	0.89 ^{ns}	0.86 ^{ns}	0.86 ^{ns}	0.87 ^{ns}
Índice de contorno	3.90	4.17 ^{ns}	3.96*	3.97 ^{ns}	4.04 ^{ns}
Coefficiente de Forma	0.84	0.74 ^{ns}	0.81 ^{ns}	0.81 ^{ns}	0.78 ^{ns}

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

A análise cariométrica revelou que os esplenócitos do grupo A+DNI, apresentaram as alterações mais significativas dos núcleos, quando comparados com os demais grupos.

Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do baço de ratos *Wistar* machos durante o 9º dia de experimento. Na tabela abaixo são comparados os dados o grupo Sham infectado (SHI), com os grupos ADX e A+D não-infectado e infectado, coincidindo com o dia do pico parasitêmico.

Tabela 12. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **baço** de ratos *Wistar* machos do grupo Sham infectado (SHI) comparado com os grupos ADX e A+D não infectado e infectado durante o 9º dia de experimento. Sham (SHI), adrenalectomizados (ADXNI e ADXI) e adrenalectomizados com dexametasona (A+DNI e A+DI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *ns* = não significativo).

Parâmetros	Grupos experimentais				
	SHI	ADXNI	A+DNI	ADXI	A+DI
Diâmetro maior (μm)	9.58	11.22 ***	10.64 ^{ns}	9.73 ^{ns}	10.51 ^{ns}
Diâmetro menor (μm)	4.39	4.57 ***	5.03 ***	4.55 ^{ns}	4.67 ^{ns}
Diâmetro médio (μm)	5.06	7.07 ^{ns}	7.27 ***	6.60 ^{ns}	6.95 **
Relação entre diâmetros	1.34	2.61 ^{ns}	2.16 ^{ns}	2.19 ^{ns}	2.33 ^{ns}
Volume nuclear (μm^3)	72.58	203.39 ***	211.59 ***	159.20 ***	185.74 ***
Perímetro (μm)	16.18	26.10 ***	25.51 ^{ns}	23.27 ^{ns}	24.85 ^{ns}
Área nuclear (μm^3)	20.56	40.62 ***	42.22 ^{ns}	34.88 ^{ns}	38.63 ^{ns}
Relação volume/superfície	3.37	4.72 ***	4.85 ^{ns}	4.40 ^{ns}	4.63 ^{ns}
Excentricidade	0.64	0.89 ^{ns}	0.86 ^{ns}	0.86 ^{ns}	0.87 ^{ns}
Índice de contorno	3.61	4.17 ^{ns}	3.96 ^{ns}	3.97 ^{ns}	4.04 ^{ns}
Coeficiente de Forma	0.97	0.74 ^{ns}	0.81 ^{ns}	0.81 ^{ns}	0.78 ^{ns}

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

Tendo como base os dados acima, nota-se que ao comparar os núcleos dos grupos SHI com os demais, o volume nuclear se modificou em todos os grupos. Porém os demais parâmetros não tiveram alterações relevantes, exceto para o ADXNI, que teve um nível significativo $p < 0.001$, quanto ao tamanho nuclear.

6.4.3.3 Fígado

Os parâmetros nucleares, resultantes do estudo morfométrico do fígado de ratos *Wistar* machos durante o 9º dia de experimento, estão demonstrados nas tabelas abaixo. É feita a comparação entre os grupos Controle, Sham, ADX e A+D não infectados e infectados.

Tabela 13. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **fígado** de ratos *Wistar* machos do grupo Controle, comparado com os demais grupos estudados (Sham, ADX e A+D) sem infecção, durante o 9º dia de experimento. Controle (CNI), Sham (SHNI), adrenalectomizados (ADXNI) e adrenalectomizados com dexametasona (A+DNI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *ns* = não significativo).

Parâmetros	Grupos experimentais			
	CNI	SHNI	ADXNI	A+DNI
Diâmetro maior (μm)	8.23	8.16 ^{ns}	7.85*	7.32***
Diâmetro menor (μm)	6.54	6.45 ^{ns}	6.26*	5.77***
Diâmetro médio (μm)	7.32	7.25 ^{ns}	7.01*	6.49***
Relação entre diâmetros	1.27	1.28 ^{ns}	1.26 ^{ns}	1.28 ^{ns}
Volume nuclear (μm^3)	218.70	213.70 ^{ns}	190.57*	148.96***
Perímetro (μm)	23.28	23.04 ^{ns}	22.26*	20.64***
Área nuclear (μm^3)	43.00	42.21 ^{ns}	39.28*	33.52***
Relação volume/superfície	4.88	4.83 ^{ns}	4.67*	4.33***
Excentricidade	0.59	0.60 ^{ns}	0.59 ^{ns}	0.60 ^{ns}
Índice de contorno	3.59	3.59 ^{ns}	3.5 ^{ns}	3.59 ^{ns}
Coeficiente de Forma	0.98	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

Verificou-se que o grupo A+DNI apresentou uma atrofia nuclear mais significativa em relação aos outros grupos, indicando que a adrenalectomia, mais a reposição de dexametasona, ocasionaram alterações importantes na morfologia nuclear.

Parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do fígado de ratos *Wistar* machos durante o 9º dia de experimento, demonstraram na tabela abaixo uma comparação do grupo controle infectado com os demais grupos infectados (Sham, ADX e A+D). Este dia coincide com o pico parasitêmico.

Tabela 14. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **fígado** de ratos *Wistar* machos do grupo Controle, comparado com os demais grupos estudados (Sham, ADX e A+D) com infecção, durante o 9º dia de experimento. Controle (CI), Sham (SHI), adrenalectomizados (ADX) e adrenalectomizados com dexametasona (A+DI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *ns* = não significativo).

Parâmetros	Grupos experimentais			
	CI	SHI	ADX	A+DI
Diâmetro maior (μm)	6.72	7.71***	8.00***	8.47***
Diâmetro menor (μm)	4.80	6.28***	6.45***	6.67***
Diâmetro médio (μm)	5.60	6.96***	7.18***	7.51***
Relação entre diâmetros	1.41	1.24***	1.25***	1.28***
Volume nuclear (μm^3)	121.60	187.71***	204.41***	233.75***
Perímetro (μm)	18.36	22.05***	22.77***	23.89***
Área nuclear (μm^3)	26.24	38.84***	41.22***	45.10***
Relação volume/superfície	3.73	4.64***	4.79***	5.01***
Excentricidade	0.64	0.57***	0.58***	0.60***
Índice de contorno	3.64	3.58***	3.58***	3.59***
Coeficiente de Forma	0.96	0.98***	0.98***	0.97***

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

Na tabela acima, notou-se atrofia marcante para todos os grupos, relativos ao tamanho e forma nuclear quando comparados com o CI. Isto sugere que a infecção causou alterações importantes no núcleo dos hepatócitos.

Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do fígado de ratos *Wistar* machos durante o 9º dia de experimento. Na tabela abaixo são comparados os dados o grupo Sham não infectado, com os grupos ADX e A+D não-infectado e infectado, coincidindo com o dia do pico parasitêmico.

Tabela 15. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **fígado** de ratos *Wistar* machos do grupo Sham não infectado comparado com os grupos ADX e A+D não infectado e infectado durante o 9º dia de experimento. Sham (SHNI), adrenalectomizados (ADXNI e ADXI) e adrenalectomizados com dexametasona (A+DNI e A+DI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *ns* = não significativo).

Parâmetros	Grupos experimentais				
	SHNI	ADXNI	A+DNI	ADXI	A+DI
Diâmetro maior (μm)	8.16	7.85*	7.32***	8.00 ^{ns}	8.47*
Diâmetro menor (μm)	6.45	6.26 ^{ns}	5.77***	6.45 ^{ns}	6.67*
Diâmetro médio (μm)	7.25	7.01 ^{ns}	6.49***	7.18 ^{ns}	7.51*
Relação entre diâmetros	1.28	1.26 ^{ns}	1.28 ^{ns}	1.25 ^{ns}	1.28 ^{ns}
Volume nuclear (μm^3)	213.70	190.57 ^{ns}	148.96***	204.41 ^{ns}	233.75*
Perímetro (μm)	23.04	22.26 ^{ns}	20.64***	22.77 ^{ns}	23.89*
Área nuclear (μm^3)	42.21	39.28 ^{ns}	33.52***	41.22 ^{ns}	45.10*
Relação volume/superfície	4.83	4.67 ^{ns}	4.33***	4.79 ^{ns}	5.01*
Excentricidade	0.60	0.59 ^{ns}	0.60 ^{ns}	0.58 ^{ns}	0.60 ^{ns}
Índice de contorno	3.59	3.5 ^{ns}	3.59 ^{ns}	3.58 ^{ns}	3.59 ^{ns}
Coeficiente de Forma	0.98	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.98 ^{ns}	0.97 ^{ns}

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

Ao compararmos a cariometria dos hepatócitos do grupo SHNI com os demais, verificou-se alteração nuclear significativa para o A+DNI, sugerindo que a reposição de dexametasona juntamente com a adrenalectomia foram suficientes para alterar a morfologia nuclear do fígado.

Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do fígado de ratos *Wistar* machos durante o 9º dia de experimento. Na tabela abaixo são comparados os dados do grupo Sham infectado, com os grupos ADX e A+D não-infectado e infectado, coincidindo com o dia do pico parasitário.

Tabela 16. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico do **fígado** de ratos *Wistar* machos do grupo Sham infectado comparado com os grupos ADX e A+D não infectado e infectado durante o 9º dia de experimento. Sham (SHI), adrenalectomizados (ADXNI e ADXI) e adrenalectomizados com dexametasona (A+DNI e A+DI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *ns* = não significativo).

Parâmetros	Grupos experimentais				
	SHI	ADXNI	A+DNI	ADXI	A+DI
Diâmetro maior (μm)	7.71	7.85 ^{ns}	7.32 ^{***}	8.00 ^{**}	8.47 ^{***}
Diâmetro menor (μm)	6.28	6.26 ^{ns}	5.77 ^{***}	6.45 ^{ns}	6.67 ^{***}
Diâmetro médio (μm)	6.96	7.01 ^{ns}	6.49 ^{***}	7.18 ^{ns}	7.51 ^{***}
Relação entre diâmetros	1.24	1.26 ^{ns}	1.28 [*]	1.25 ^{ns}	1.28 [*]
Volume nuclear (μm^3)	187.71	190.57 ^{ns}	148.96 ^{***}	204.41 ^{ns}	233.75 ^{***}
Perímetro (μm)	22.05	22.26 ^{ns}	20.64 ^{***}	22.77 ^{ns}	23.89 ^{***}
Área nuclear (μm^3)	38.84	39.28 ^{ns}	33.52 ^{***}	41.22 ^{ns}	45.10 ^{***}
Relação volume/superfície	4.64	4.67 ^{ns}	4.33 ^{***}	4.79 ^{ns}	5.01 ^{***}
Excentricidade	0.57	0.59 ^{ns}	0.60 ^{ns}	0.58 ^{ns}	0.60 [*]
Índice de contorno	3.58	3.5 ^{ns}	3.59 [*]	3.58 ^{ns}	3.59 [*]
Coefficiente de Forma	0.98	0.98 ^{ns}	0.98 [*]	0.98 ^{ns}	0.97 [*]

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

A análise cariométrica dos grupos infectados e não infectados comparados com o grupo SHI, demonstrou alteração significativa para os grupos A+DNI e A+DI, tanto no tamanho como na forma nuclear. Mais uma vez, a adrenalectomia, a reposição de dexametasona e a infecção provocada pelo parasita, influência nos núcleos das células.

6.4.3.4 Timo – região do córtex

Parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico da região cortical do timo de ratos *Wistar* machos durante o 9º dia de experimento, demonstram na tabela abaixo a comparação do grupo controle com os demais (Sham, ADX e A+D) não infectados.

Tabela 17. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico da região **cortical do timo**, de ratos *Wistar* machos do grupo controle, comparado com os demais grupos estudados (Sham, ADX e A+D) sem infecção, durante o 9º dia de experimento. Controle (CNI), Sham (SHNI), adrenalectomizados (ADXNI) e adrenalectomizados com dexametasona (A+DNI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *ns* = não significativo).

Grupos experimentais	CNI	SHNI	ADXNI	A+DNI
Parâmetros				
Diâmetro maior (μm)	4.42	4.87***	4.76***	5.78***
Diâmetro menor (μm)	3.31	3.75***	3.71***	4.36***
Diâmetro médio (μm)	3.82	4.26***	4.20***	5.02***
Relação entre diâmetros	1.34	1.31***	1.29***	1.34 ^{ns}
Volume nuclear (μm^3)	30.13	42.20***	40.09***	68.02***
Perímetro (μm)	12.21	13.60***	13.37***	16.03***
Área nuclear (μm^3)	11.58	14.47***	14.00***	19.95***
Relação volume/superfície	2.55	2.84***	2.80***	3.34***
Excentricidade	0.65	0.62***	0.61***	0.64 ^{ns}
Índice de contorno	3.61	3.60***	3.59***	3.61 ^{ns}
Coeficiente de Forma	0.97	0.97***	0.97***	0.97 ^{ns}

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

Avaliando a cariometria das células corticais do timo, notou-se que ao comparar o grupo CNI com os demais, pôde-se observar que, principalmente os grupos SHNI e ADXNI apresentaram núcleos atrofiados com alterações marcantes, quanto a forma e ao tamanho.

Parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico da região cortical do timo de ratos *Wistar* machos durante o 9º dia de experimento, demonstraram na tabela abaixo uma comparação do grupo controle infectado com os demais grupos infectados (Sham, ADX e A+D). Este dia coincide com o pico parasitêmico.

Tabela 18. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico da região **cortical do timo** de ratos *Wistar* machos do grupo controle infectado, comparado com os demais grupos estudados (Sham, ADX e A+D) com infecção, durante o 9º dia de experimento. Controle (CI), Sham (SHI), adrenalectomizados (ADX) e adrenalectomizados com dexametasona (A+DI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *ns* = não significativo).

Parâmetros	Grupos experimentais			
	CI	SHI	ADX	A+DI
Diâmetro maior (μm)	4.43	4.80 ^{***}	4.69 ^{***}	5.01 ^{***}
Diâmetro menor (μm)	3.31	3.56 ^{***}	3.57 ^{***}	3.72 ^{***}
Diâmetro médio (μm)	3.82	4.13 ^{***}	4.08 ^{***}	4.31 ^{***}
Relação entre diâmetros	1.34	1.37 ^{ns}	1.32 ^{**}	1.36 ^{ns}
Volume nuclear (μm^3)	30.21	38.24 ^{***}	36.68 ^{***}	43.40 ^{***}
Perímetro (μm)	12.23	13.23 ^{***}	13.03 ^{***}	13.80 ^{***}
Área nuclear (μm^3)	11.60	13.56 ^{***}	13.22 ^{***}	14.76 ^{***}
Relação volume/superfície	2.55	2.75 ^{***}	2.72 ^{***}	2.87 ^{***}
Excentricidade	0.65	0.65 ^{ns}	0.63 ^{**}	0.65 ^{ns}
Índice de contorno	3.61	3.62 ^{ns}	3.60 ^{**}	3.61 ^{ns}
Coeficiente de Forma	0.97	0.96 ^{ns}	0.97 ^{**}	0.96 ^{ns}

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

A análise cariométrica dos timócitos corticais dos grupos infectados demonstrou valores nucleares significativos para o grupo ADXI, sugerindo que a ausência do hormônio mais à infecção alterou a conformação dos núcleos.

Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico da região cortical do tmo de ratos *Wistar* machos durante o 9º dia de experimento. Na tabela abaixo são comparados os dados o grupo Sham não infectado, com os grupos ADX e A+D não-infectado e infectado, coincidindo com o dia do pico parasitêmico.

Tabela 19. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico da região **cortical do tmo** de ratos *Wistar* machos do grupo Sham não infectado comparado com os grupos ADX e A+D não infectado e infectado durante o 9º dia de experimento. Sham (SHNI), adrenalectomizados (ADXNI e ADXI) e adrenalectomizados com dexametasona (A+DNI e A+DI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *ns* = não significativo).

Grupos experimentais	SHNI	ADXNI	A+DNI	ADXI	A+DI
Parâmetros					
Diâmetro maior (μm)	4.87	4.76***	5.78***	4.69*	5.01 ***
Diâmetro menor (μm)	3.75	3.71***	4.36***	3.57 ^{ns}	3.72***
Diâmetro médio (μm)	4.26	4.20***	5.02***	4.08 ^{ns}	4.31 ***
Relação entre diâmetros	1.31	1.29**	1.34 ***	1.32***	1.36 ***
Volume nuclear (μm^3)	42.20	40.09***	68.02***	36.68 ^{ns}	43.40 ***
Perímetro (μm)	13.60	13.37***	16.03***	13.03 ^{ns}	13.80***
Área nuclear (μm^3)	14.47	14.00***	19.95***	13.22 ^{ns}	14.76 ^{ns}
Relação volume/superfície	2.84	2.80***	3.34***	2.72 ^{ns}	2.87 ***
Excentricidade	0.62	0.61**	0.64 ***	0.63 ***	0.65***
Índice de contorno	3.60	3.59**	3.61 ***	3.60 ***	3.61 ***
Coeficiente de Forma	0.97	0.97**	0.97 ***	0.97 ***	0.96 ***

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

Tendo como base o grupo SHNI em comparação com os demais, verificou-se que as alterações nucleares mais importantes foram encontradas nos grupos ADXNI, A+DNI e A+DI, sugerindo que a ausência do hormônio mediante a adrenalectomia e a reposição de um hormônio sintético modifica a forma e o tamanho do timócito.

Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico da região cortical do timo de ratos *Wistar* machos durante o 9º dia de experimento. Na tabela abaixo são comparados os dados o grupo Sham infectado, com os grupos ADX e A+D não-infectado e infectado, coincidindo com o dia do pico parasitêmico.

Tabela 20. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico da região **cortical do timo** de ratos *Wistar* machos do grupo Sham infectado comparado com os grupos ADX e A+D não infectado e infectado durante o 9º dia de experimento. Sham (SHI), adrenalectomizados (ADXNI e ADXI) e adrenalectomizados com dexametasona (A+DNI e A+DI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *ns* = não significativo).

Parâmetros	Grupos experimentais				
	SHI	ADXNI	A+DNI	ADXI	A+DI
Diâmetro maior (μm)	4.80	4.76 ^{ns}	5.78***	4.69*	5.01***
Diâmetro menor (μm)	3.56	3.71***	4.36 ^{ns}	3.57***	3.72 ^{ns}
Diâmetro médio (μm)	4.13	4.20 ^{ns}	5.02***	4.08***	4.31 ^{ns}
Relação entre diâmetros	1.37	1.29***	1.34 ^{ns}	1.32***	1.36***
Volume nuclear (μm^3)	38.24	40.09 ^{ns}	68.02***	36.68***	43.40 ^{ns}
Perímetro (μm)	13.23	13.37**	16.03***	13.03***	13.80**
Área nuclear (μm^3)	13.56	14.00***	19.95***	13.22 ^{ns}	14.76***
Relação volume/superfície	2.75	2.80 ^{ns}	3.34***	2.72***	2.87 ^{ns}
Excentricidade	0.65	0.61***	0.64 ^{ns}	0.63 ^{ns}	0.65***
Índice de contorno	3.62	3.59***	3.61 ^{ns}	3.60 ^{ns}	3.61***
Coeficiente de Forma	0.96	0.97***	0.97 ^{ns}	0.97 ^{ns}	0.96***

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

Observando os dados da tabela acima, verificou-se que para os grupos ADXNI e A+DI a morfologia nuclear foi significativamente diferente, apresentando núcleos mais elíptoides, enquanto que os grupos A+DNI e ADXI, apresentaram uma atrofia dos timócitos.

6.4.3.5 Timo – região medular

Parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico da região medular do timo de ratos *Wistar* machos durante o 9º dia de experimento, demonstraram na tabela abaixo a comparação do grupo controle com os demais (Sham, ADX e A+D) não infectados.

Tabela 21. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico da região **medular do timo**, de ratos *Wistar* machos do grupo Controle, comparado com os demais grupos estudados (Sham, ADX e A+D) sem infecção, durante o 9º dia de experimento. Controle (CNI), sham (SHNI), adrenalectomizados (ADXNI) e adrenalectomizados com dexametasona (A+DNI), ($*p < 0,01$, $**p < 0,05$, $***p < 0,001$, $ns =$ não significativo).

Grupos experimentais	CNI	SHNI	ADXNI	A+DNI
Parâmetros				
Diâmetro maior (μm)	5.60	5.30***	5.15***	5.35***
Diâmetro menor (μm)	4.24	4.00***	3.88***	4.05***
Diâmetro médio (μm)	4.86	4.59***	4.46***	4.65***
Relação entre diâmetros	1.33	1.35 ^{ns}	1.35 ^{ns}	1.3 ^{ns}
Volume nuclear (μm^3)	61.77	52.57***	48.28***	54.36***
Perímetro (μm)	15.54	14.69***	14.26***	14.84***
Área nuclear (μm^3)	18.74	16.76***	15.83***	17.15***
Relação volume/superfície	3.24	3.06***	2.97***	3.10***
Excentricidade	0.63	0.64 ^{ns}	0.64 ^{ns}	0.63 ^{ns}
Índice de contorno	3.61	3.62 ^{ns}	3.61 ^{ns}	3.61 ^{ns}
Coeficiente de Forma	0.97	0.96 ^{ns}	0.96 ^{ns}	0.97 ^{ns}

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

De uma maneira geral, todos os grupos analisados comparados com o CNI, apresentaram níveis significativos, no que se refere ao volume nuclear, levando estes, a uma atrofia nuclear.

Parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico da região medular do timo de ratos *Wistar* machos durante o 9º dia de experimento, apresentaram na tabela abaixo uma comparação do grupo controle infectado com os demais grupos infectados (Sham, ADX e A+D). Este dia coincide com o pico parasitêmico.

Tabela 22. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico da região **medular do timo** de ratos *Wistar* machos do grupo Controle infectado, comparado com os demais grupos estudados (Sham, ADX e A+D) com infecção, durante o 9º dia de experimento. Controle (CI), Sham (SHI), adrenalectomizados (ADX) e adrenalectomizados com dexametasona (A+DI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ns = não significativo).

Grupos experimentais	CI	SHI	ADX	A+DI
Parâmetros				
Diâmetro maior (μm)	4.81	5.04***	5.31***	5.21***
Diâmetro menor (μm)	3.60	3.78***	3.80***	3.88***
Diâmetro médio (μm)	4.15	4.36***	4.48***	4.48***
Relação entre diâmetros	1.35	1.34 ^{ns}	1.41***	1.35 ^{ns}
Volume nuclear (μm^3)	38.61	44.67***	48.29***	48.73***
Perímetro (μm)	13.28	13.93***	14.42***	14.36***
Área nuclear (μm^3)	13.68	15.06***	15.90***	15.96***
Relação volume/superfície	2.77	2.90***	2.99***	2.99***
Excentricidade	0.65	0.64 ^{ns}	0.68***	0.65 ^{ns}
Índice de contorno	3.61	3.61 ^{ns}	3.63***	3.61 ^{ns}
Coeficiente de Forma	0.96	0.97 ^{ns}	0.95***	0.96 ^{ns}

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

Com base nos dados apresentados, verificou-se que o grupo ADXI teve as maiores alterações nucleares, tanto para a forma quanto para o tamanho nuclear, demonstrando que a operação, a falta do hormônio, e mais a infecção modificaram os núcleos.

Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico da região medular do timo de ratos *Wistar* machos durante o 9º dia de experimento. Na tabela abaixo são comparados os dados o grupo Sham não infectado, com os grupos ADX e A+D não-infectado e infectado.

Tabela 23. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico da região **medular do timo** de ratos *Wistar* machos do grupo Sham não infectado comparado com os grupos ADX e A+D não infectado e infectado durante o 9º dia de experimento. Sham (SHNI), adrenalectomizados (ADXNI e ADXI) e adrenalectomizados com dexametasona (A+DNI e A+DI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ns = não significativo).

Parâmetros	Grupos experimentais				
	SHNI	ADXNI	A+DNI	ADXI	A+DI
Diâmetro maior (μm)	5.30	5.15**	5.35 ^{ns}	5.31 ^{ns}	5.21 ^{ns}
Diâmetro menor (μm)	4.00	3.88*	4.05 ^{ns}	3.80***	3.88***
Diâmetro médio (μm)	4.59	4.46 ^{ns}	4.65 ^{ns}	4.48*	4.48*
Relação entre diâmetros	1.35	1.35 ^{ns}	1.3 ^{ns}	1.41***	1.35 ^{ns}
Volume nuclear (μm^3)	52.57	48.28***	54.36 ^{ns}	48.29*	48.73*
Perímetro (μm)	14.69	14.26***	14.84 ^{ns}	14.42**	14.36*
Área nuclear (μm^3)	16.76	15.83***	17.15 ^{ns}	15.90*	15.96*
Relação volume/superfície	3.06	2.97 ^{ns}	3.10 ^{ns}	2.99*	2.99*
Excentricidade	0.64	0.64 ^{ns}	0.63 ^{ns}	0.68***	0.65 ^{ns}
Índice de contorno	3.62	3.61***	3.61 ^{ns}	3.63***	3.61 ^{ns}
Coeficiente de Forma	0.96	0.96 ^{ns}	0.97 ^{ns}	0.95***	0.96 ^{ns}

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

Verificando os dados da tabela, somente o grupo ADXI apresentou alterações relevantes na morfologia nuclear quando comparado com o grupo SHNI.

Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico da região medular do timo de ratos *Wistar* machos durante o 9º dia de experimento. Na tabela abaixo são comparados os dados o grupo Sham infectado, com os grupos ADX e A+D não-infectado e infectado, coincidindo com o dia do pico parasitêmico.

Tabela 24. Valores médios dos parâmetros nucleares resultantes do estudo morfométrico da região **medular do timo** de ratos *Wistar* machos do grupo Sham infectado comparado com os grupos ADX e A+D não infectado e infectado durante o 9º dia de experimento. Sham (SHI), adrenalectomizados (ADXNI e ADXI) e adrenalectomizados com reposição dexametasona (A+DNI e A+DI), (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ns = não significativo).

Parâmetros	Grupos experimentais				
	SHI	A+DNI	ADXNI	ADXI	A+DI
Diâmetro maior (μm)	5.04	5.35 *	5.31 ***	5.31 ***	5.21***
Diâmetro menor (μm)	3.78	4.05 *	3.80***	3.80 ^{ns}	3.88*
Diâmetro médio (μm)	4.36	4.65 *	4.48***	4.48***	4.48***
Relação entre diâmetros	1.34	1.3 ns	1.41 ^{ns}	1.41***	1.35 ^{ns}
Volume nuclear (μm^3)	44.67	54.36 *	48.29***	48.29***	48.73***
Perímetro (μm)	13.93	14.84 *	14.42***	14.42***	14.36***
Área nuclear (μm^3)	15.06	17.15 *	15.90***	15.90***	15.96***
Relação volume/superfície	2.90	3.10 *	2.99***	2.99***	2.99***
Excentricidade	0.64	0.63 ^{ns}	0.68 ^{ns}	0.68***	0.65 ^{ns}
Índice de contorno	3.61	3.61 ^{ns}	3.63 ^{ns}	3.63***	3.61 ^{ns}
Coeficiente de Forma	0.97	0.97 ^{ns}	0.95 ^{ns}	0.95***	0.96 ^{ns}

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{ns} não significativo

A análise cariométrica dos grupos infectados revelou uma alteração significativa da forma nuclear principalmente do grupo ADXI que apresentou núcleos com morfologia alterada; a atrofia nuclear só pôde ser observada nos grupos ADXNI e A+DI.

6.4.4 Histopatologia

Foi realizada a análise histopatológica do coração, baço, timo e fígado de ratos *Wistar* machos infectados ou não com a cepa Y de *T.cruzi* em grupos controle, sham, adrenalectomizados e adrenalectomizados com reposição de dexametasona.

A seguir, estão apresentadas as alterações histopatológicas destes órgãos, compreendidos no 9º dia de experimento, correspondendo ao dia do pico parasitário.

6.4.4.1 Análise Histopatológica do coração

6.4.4.1.1. Grupo controle sem infecção e infectado

As fibras cardíacas dos animais do grupo Controle sem infecção não apresentaram alterações teciduais, demonstrando aspecto histopatológico normal. Por outro lado, o grupo Controle infectado apresentou fibras cardíacas dispersas, infiltrado inflamatório em alguns pontos e grande quantidade de ninhos de amastigotas, principalmente no 9º dia de experimento, coincidindo com o pico parasitário.

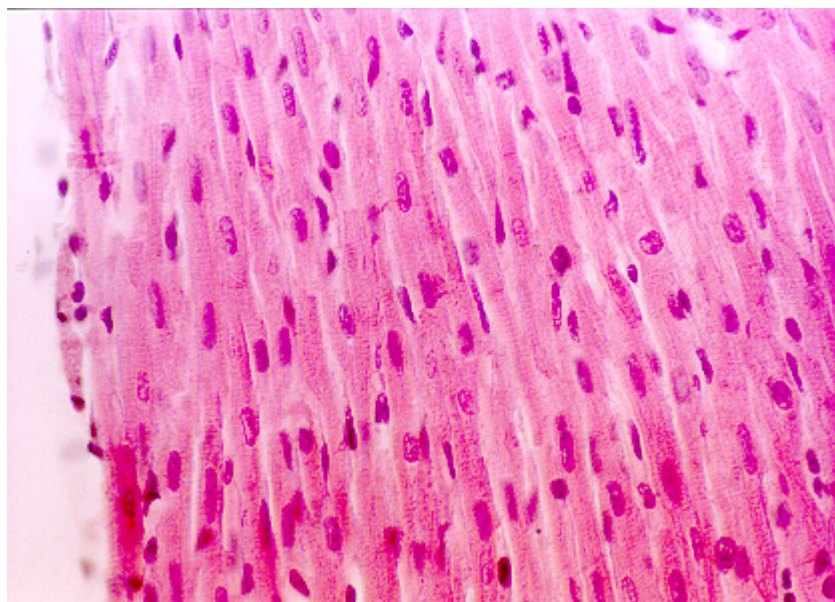


Figura 1. Corte histológico do coração (6µm) de ratos *Wistar* machos do grupo Controle sem infecção (CNI). Hematoxilina e eosina (400x).

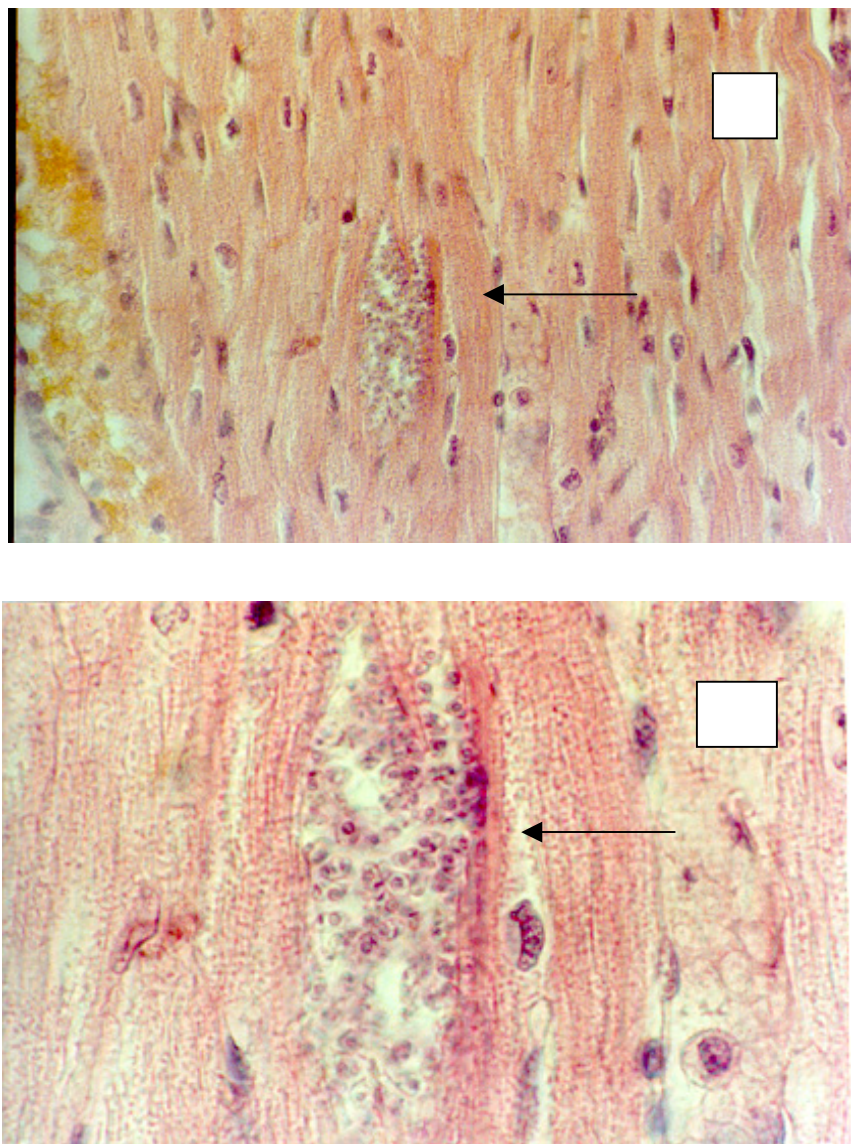


Figura 2. Corte histológico (6 μ m) do coração de ratos Wistar machos do grupo Controle infectado (CI), corados por hematoxilina-eosina (A-400x e B-1000x). Verificar a presença de ninhos de amastigotas.

6.4.4.1.2 Grupo Sham sem infecção e infectado

As fibras cardíacas dos animais do grupo Sham sem infecção não apresentaram alterações teciduais, demonstrando aspecto histopatológico normal. O grupo Sham infectado, mostrou alterações das fibras cardíacas, presença de alguns ninhos de amastigotas e infiltrado inflamatório.

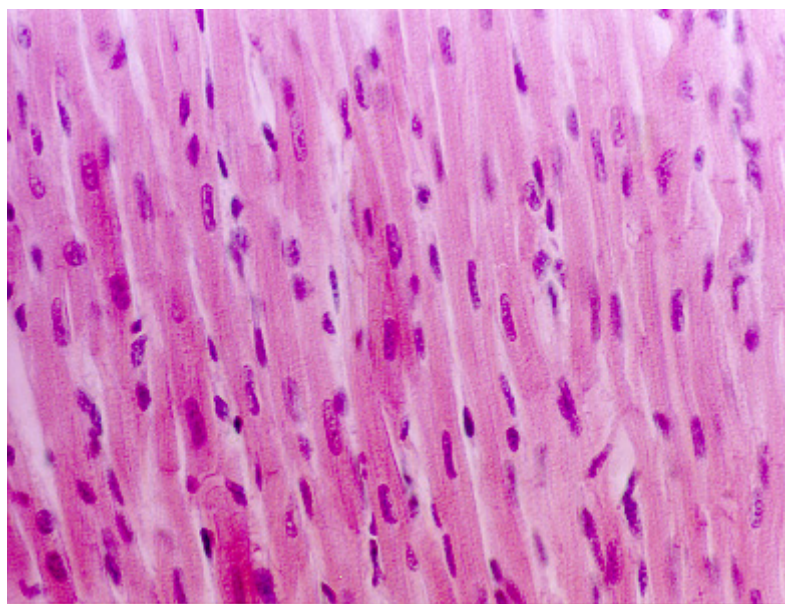


Figura 3. Corte histológico do coração (6µm) de ratos *Wistar* machos do grupo Sham sem infecção (SHNI). Hematoxilina e eosina (400x).

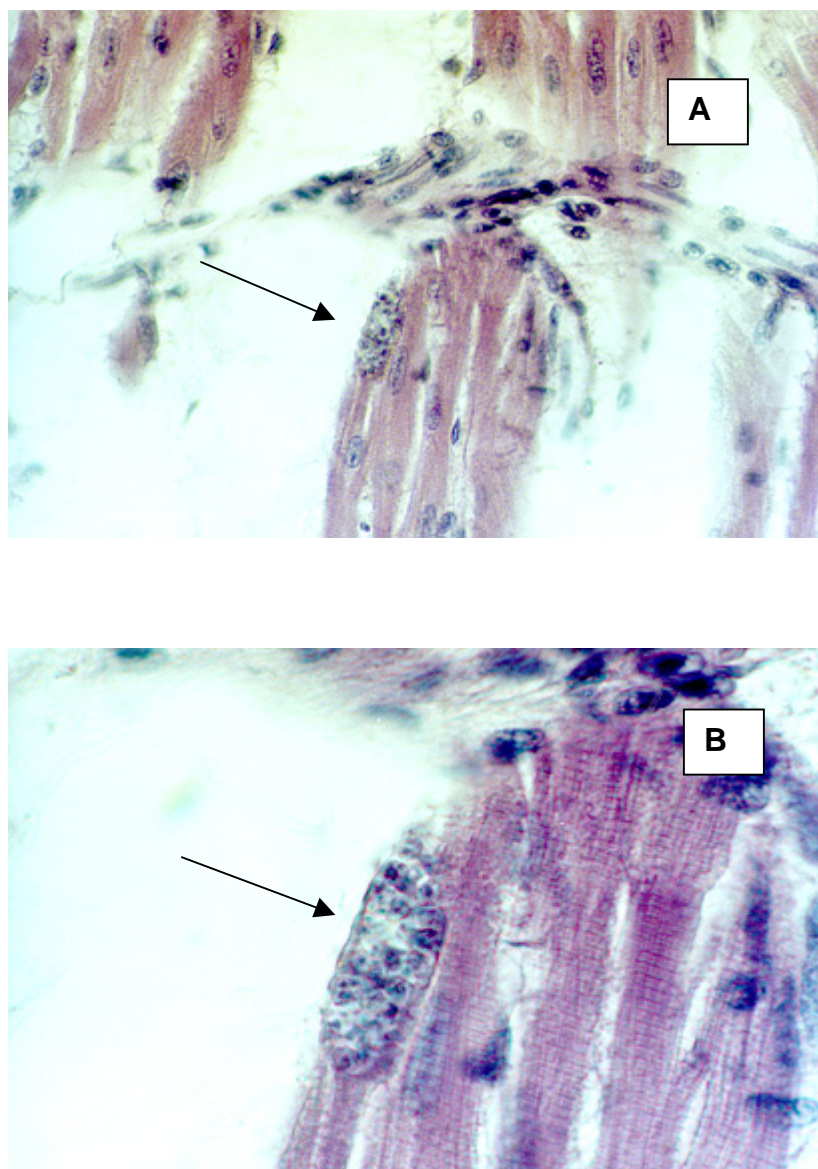


Figura 4. Corte histológico (6 μ m) do coração de ratos *Wistar* machos do grupo Sham infectado (SHI), corados por hematoxilina-eosina (A-400x e B-1000x). Verificar a presença de ninhos de amastigotas.

6.4.4.1.3 Grupo ADX sem infecção e infectado

As fibras cardíacas dos animais do grupo ADX sem infecção não apresentaram alterações teciduais, mantendo sua morfologia histopatológica normal. Porém, o grupo ADX infectado apresentou desorganização das fibras cardíacas, presença de alguns ninhos de amastigotas e processo inflamatório.

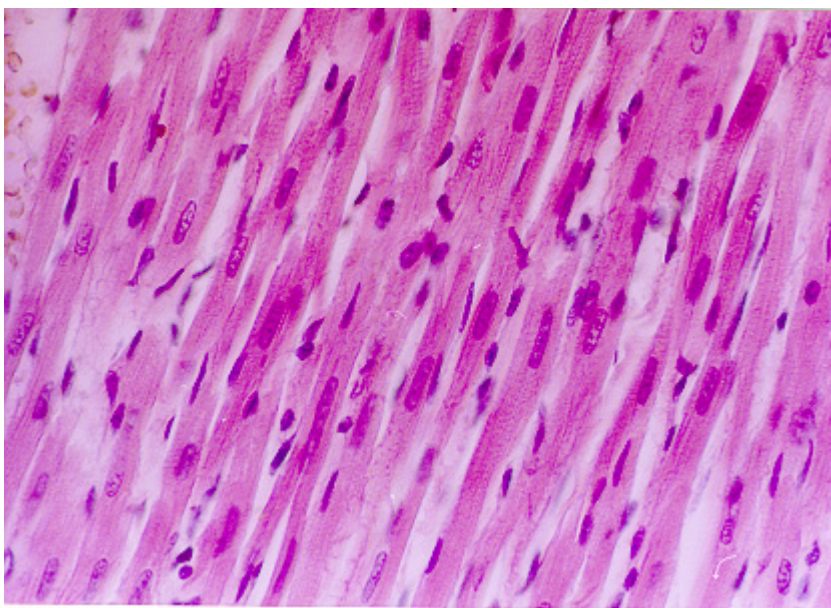


Figura 5. Corte histológico do coração (6µm) de ratos *Wistar* machos do grupo ADX sem infecção (ADXNI). Hematoxilina e eosina (400x).

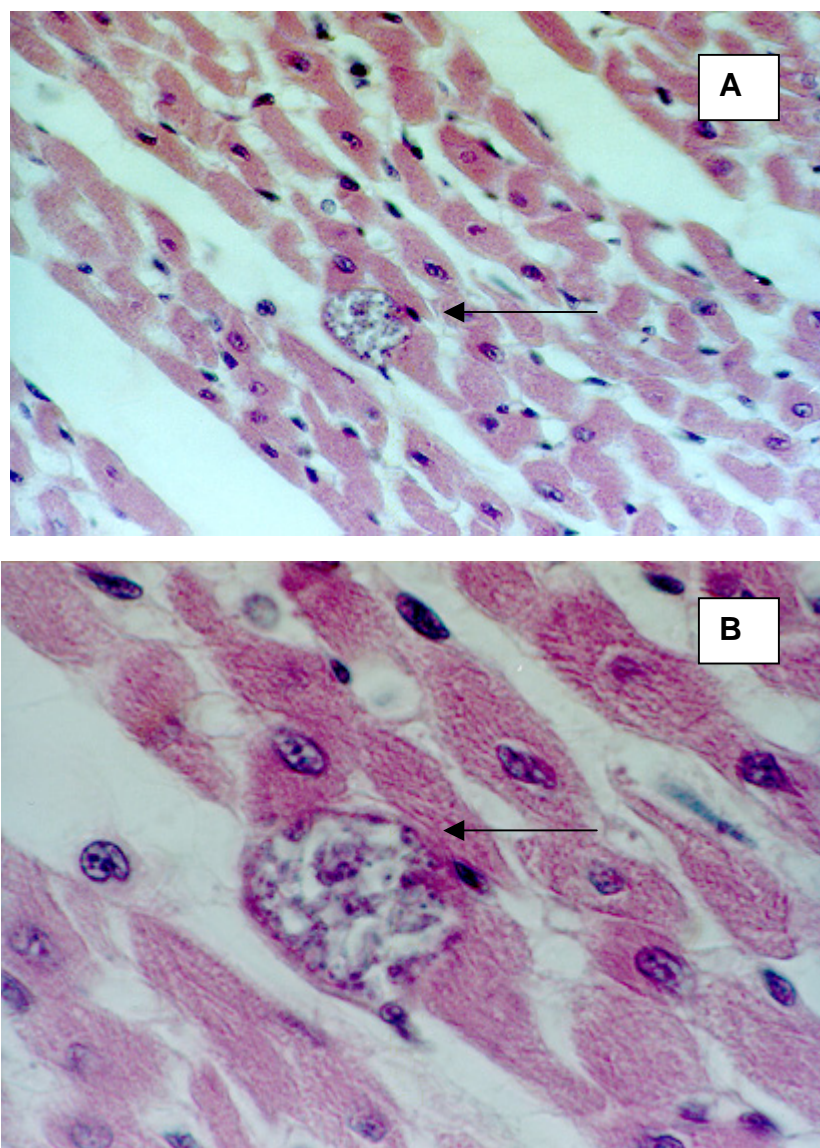


Figura 6. Corte histológico (6 μ m) do coração de ratos *Wistar* machos do grupo ADX infectado (ADX_I), corados por hematoxilina-eosina (A-400x e B-1000x). Verificar a presença de ninhos de amastigotas.

6.4.4.1.4 Grupo A+D sem infecção e infectado

As fibras cardíacas dos animais do grupo A+D sem infecção não tiveram alterações teciduais, demonstrando morfologia do miocárdio normal. Já o grupo infectado, apresentou alterações das fibras cardíacas, presença de alguns ninhos de amastigotas e infiltrado inflamatório.

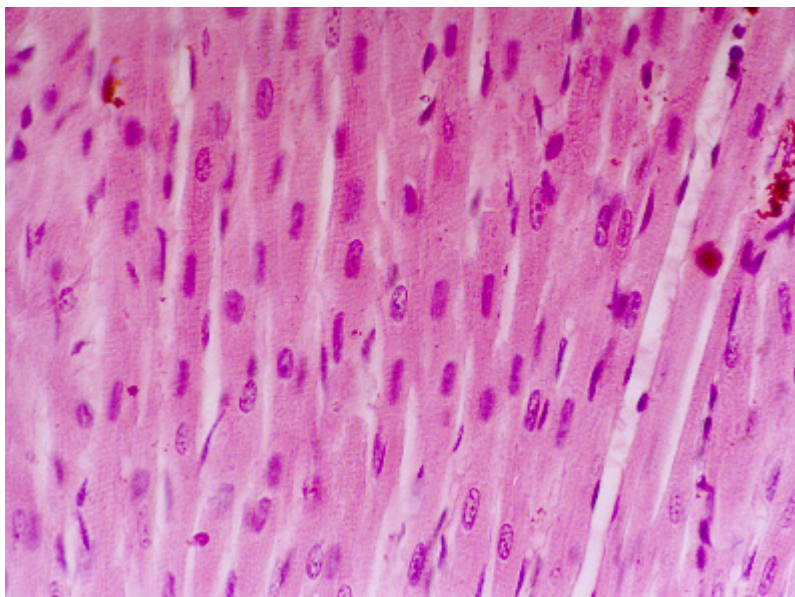


Figura 7. Corte histológico do coração (6µm) de ratos *Wistar* machos do grupo A+D sem infecção (A+DNI). Hematoxilina e eosina (400x).

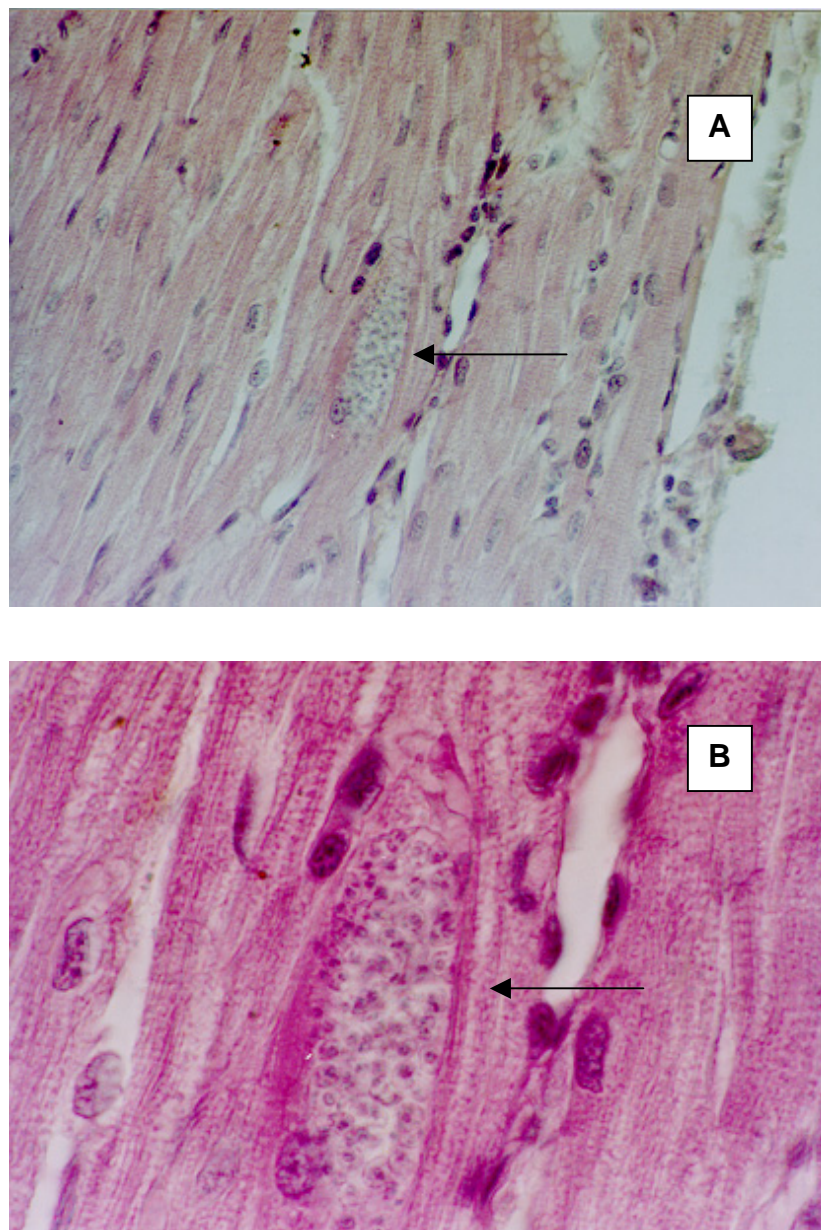


Figura 8. Corte histológico (6 μ m) do coração de ratos *Wistar* machos do grupo A+D infectado (A+DI), corados por hematoxilina-eosina (A-400x e B-1000x). Verificar a presença de ninhos de amastigotas.

6.4.4.2 Análise Histopatológica do baço

6.4.4.2.1 Grupo Controle sem infecção e infectado

No grupo Controle sem infecção observou-se aspecto normal das células esplênicas e folículos linfóides. O grupo Controle infectado, apresentou alterações das células, com infiltrado inflamatório, porém com ausência de ninhos de amastigotas.

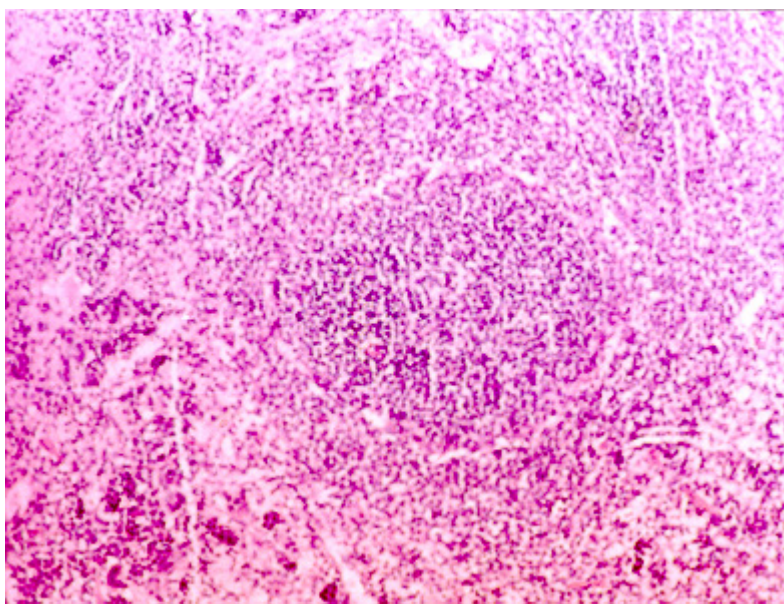


Figura 9. Corte histológico do baço (6 μ m) de ratos *Wistar* machos do grupo Controle sem infecção (CNI). Hematoxilina e eosina (100x).

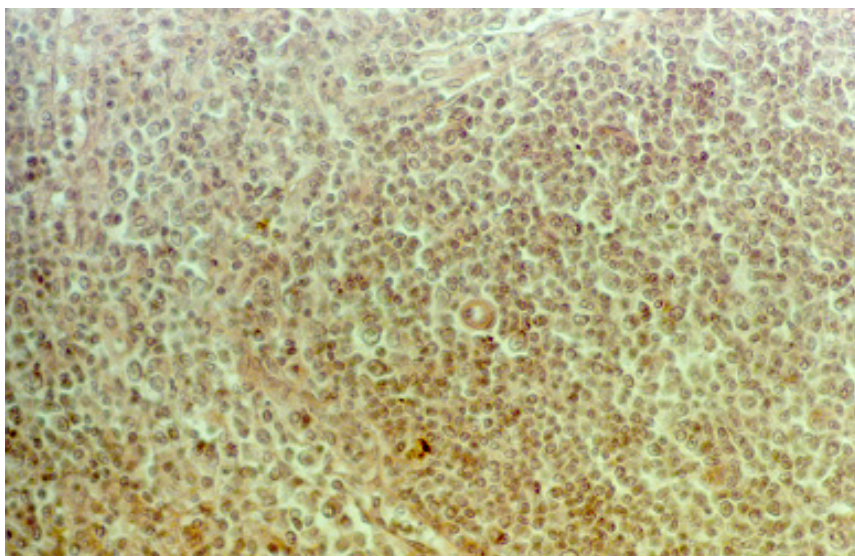


Figura 10. Corte histológico do baço (6 μ m) de ratos *Wistar* machos do grupo Controle infectado (CI). Hematoxilina e eosina (250x).

6.4.4.2.2 Grupo Sham sem infecção e infectado

No grupo Sham sem infecção observou-se aspecto normal das células esplênicas e folículos linfóides. Porém, o grupo Sham infectado, apresentou alterações das células e infiltrado inflamatório. Não foi verificada a presença de ninhos de amastigotas.

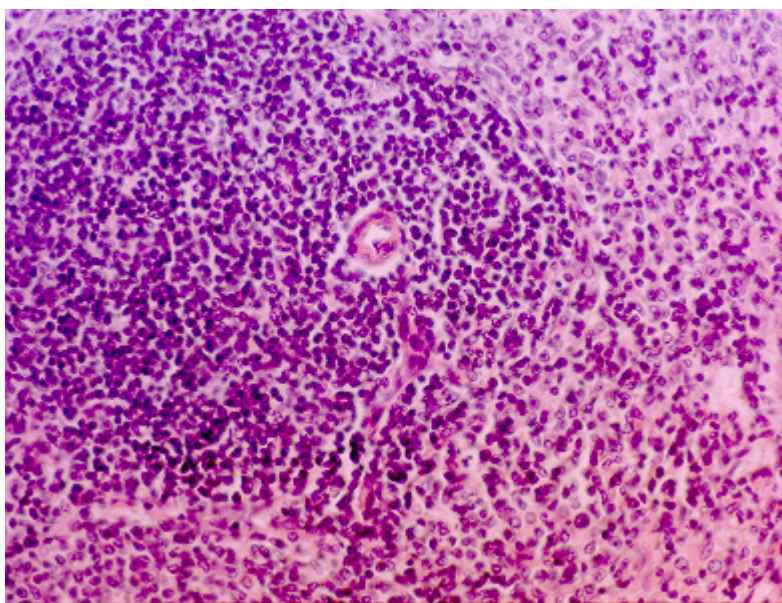


Figura 11. Corte histológico do baço (6µm) de ratos *Wistar* machos do grupo Sham sem infecção (SHNI). Hematoxilina e eosina (100x).

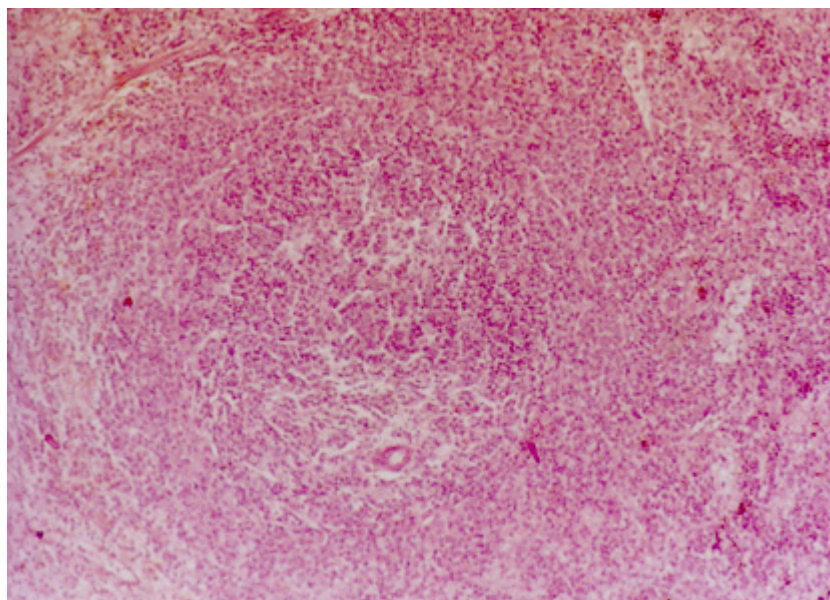


Figura 12. Corte histológico do baço (6µm) de ratos *Wistar* machos do grupo Sham infectado (SHI). Hematoxilina e eosina (100x).

6.4.4.2.3 Grupo ADX sem infecção e infectado

No grupo ADX sem infecção, não foi constatada nenhuma alteração quanto a morfologia das células esplênicas e dos folículos linfóides. O grupo ADX infectado apresentou alterações nas células, com infiltrado inflamatório, desorganização da polpa branca e da polpa vermelha, porém sem a presença de ninhos de amastigotas.

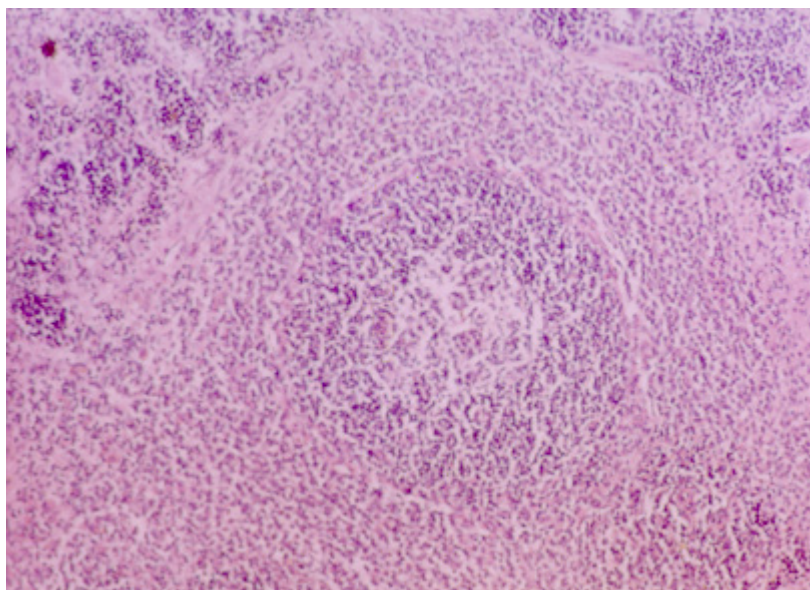


Figura 13. Corte histológico do baço (6µm) de ratos *Wistar* machos do grupo ADX não infectado (ADXNI). Hematoxilina e eosina (100x).

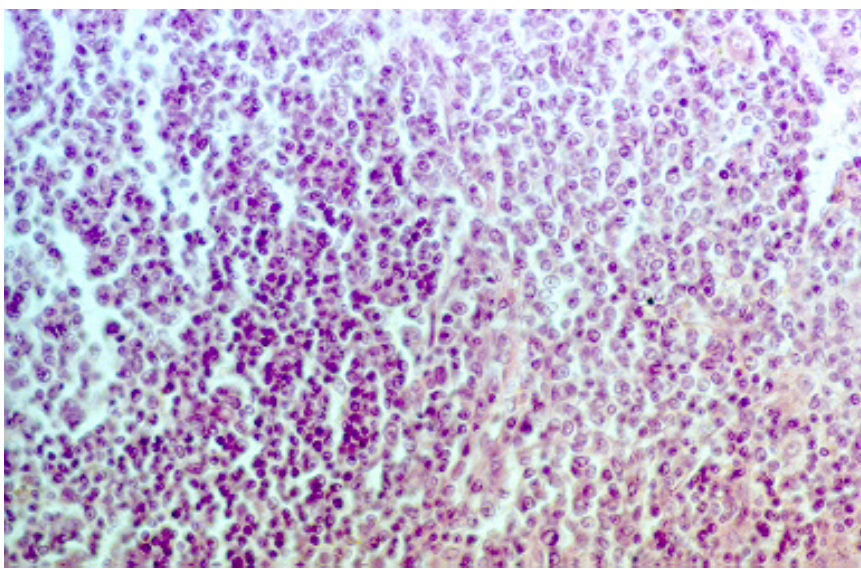


Figura 14. Corte histológico do baço (6µm) de ratos *Wistar* machos do grupo ADX infectado (ADX1). Hematoxilina e eosina (250x).

6.4.4.2.4 Grupo A+D sem infecção e infectado

No grupo A+D sem infecção observou-se morfologia normal dos folículos linfóides e das células esplênicas. O grupo A+D infectado, apresentou alterações nas células, ficando mais dispersas, com infiltrado inflamatório, desorganização da polpa branca e da polpa vermelha. Entretanto, não foi encontrado ninhos de amastigotas.

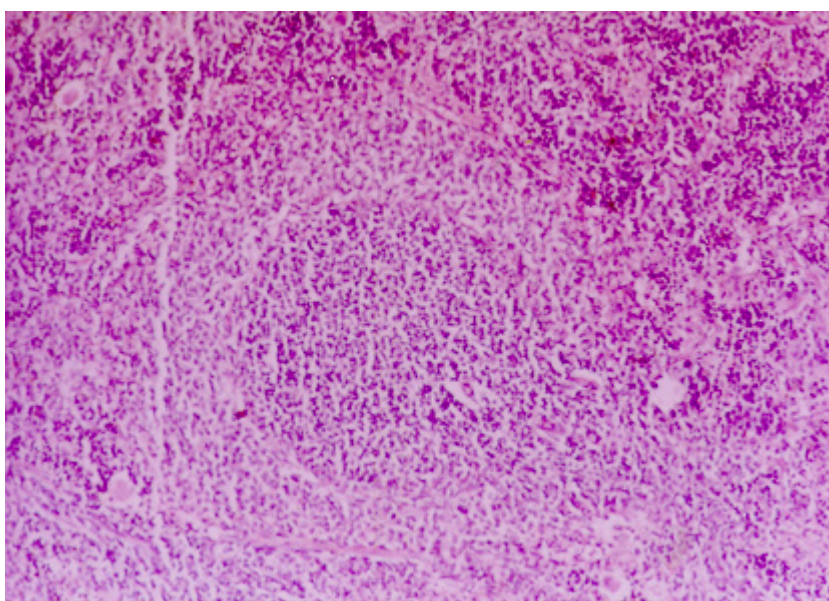


Figura 15. Corte histológico do baço (6 μ m) de ratos *Wistar* machos do grupo A+D não infectado (A+DNI). Hematoxilina e eosina (100x).

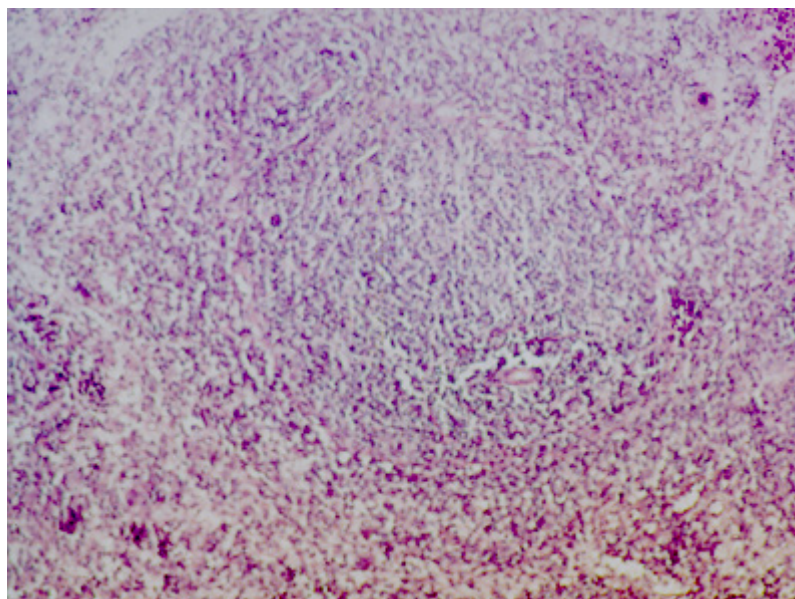


Figura 16. Corte histológico do baço (6µm) de ratos *Wistar* machos do grupo A+D infectado (A+DI). Hematoxilina e eosina (100x).

6.4.4.3 Análise Histopatológica do fígado

6.4.4.3.1 Grupo Controle sem infecção e infectado

No grupo Controle sem infecção apresentou-se aspecto normal das células hepáticas. O grupo Controle infectado, notou-se hepatócitos descaracterizados, alguns com citoplasma vacuolizados e sinusóides dilatados. Não foi observada presença de ninhos de amastigotas.

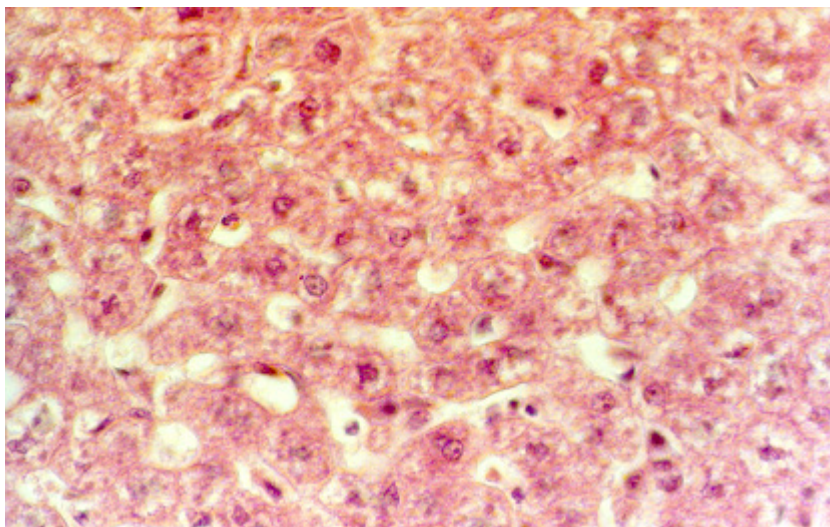


Figura 17. Corte histológico do fígado (6 μ m) de ratos *Wistar* machos do grupo Controle não infectado (CNI). Hematoxilina e eosina (400x).

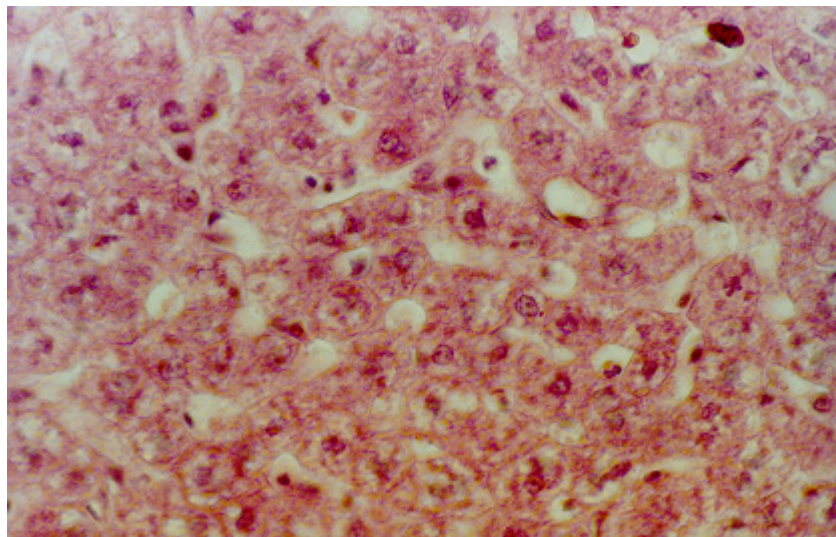


Figura 18. Aspecto histológico do fígado de ratos *Wistar* machos do grupo Controle infectado (CI). Hematoxilina e eosina (400x).

6.4.4.3.2 Grupo Sham sem infecção e infectado

O grupo Sham sem infecção apresentou poucas alterações quanto à morfologia das células hepáticas. Já no grupo Sham infectado verificou-se que as células hepáticas estavam desorganizadas, algumas com citoplasma vacuolizado e presença de infiltrado inflamatório. Não foi observado presença de ninhos de amastigotas no órgão.

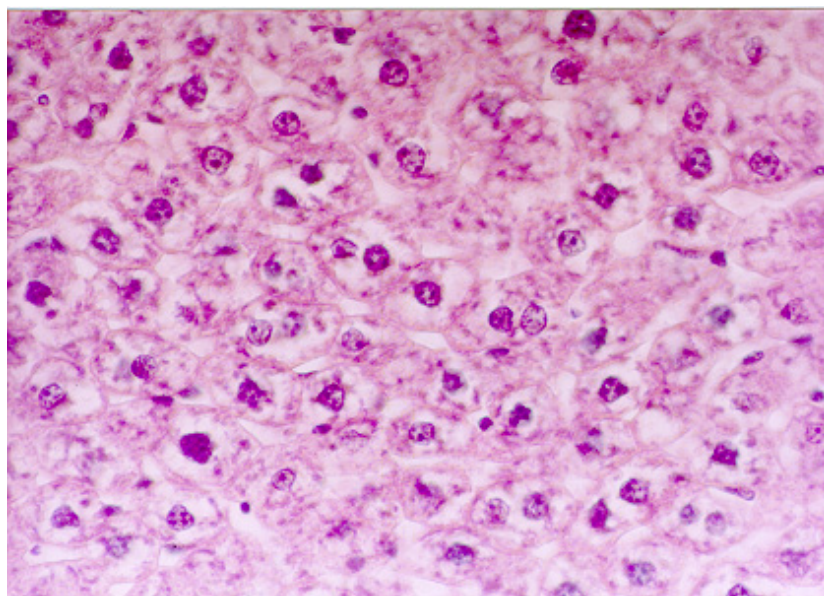


Figura 19. Corte histológico do fígado (6 μ m) de ratos *Wistar* machos do grupo Sham não infectado (SHNI). Hematoxilina e eosina (400x).

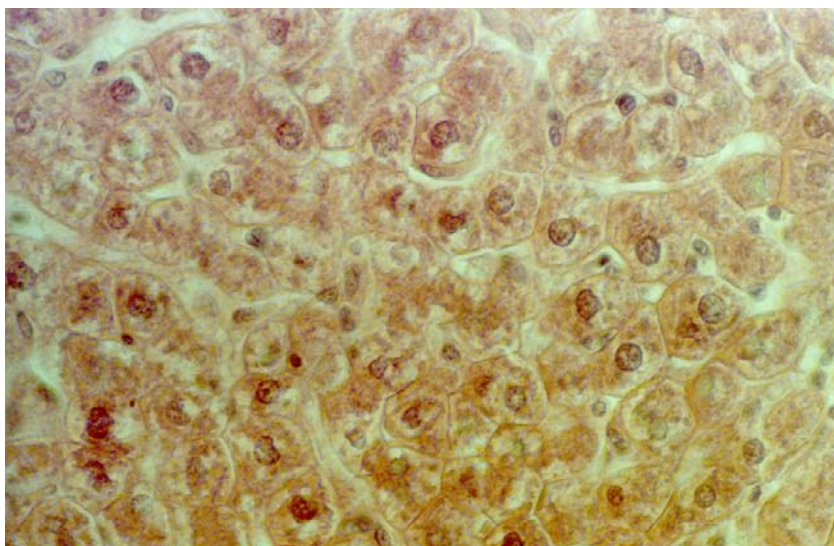


Figura 20. Corte histológico do fígado (6 μ m) de ratos *Wistar* machos do grupo Sham infectado (SHI). Hematoxilina e eosina (400x).

6.4.4.3.3 Grupo ADX sem infecção e infectado

No grupo ADX sem infecção observou-se aspecto normal das células hepáticas. O grupo ADX infectado verificou-se alterações morfológicas relevantes dos núcleos das células hepáticas, com presença de infiltrado inflamatório. Porém, não foi observado presença de ninhos de amastigotas.

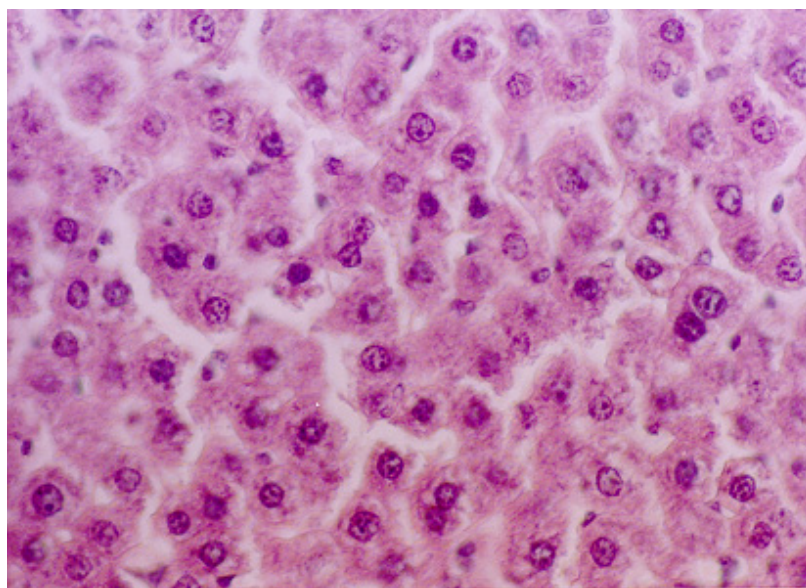


Figura 21. Corte histológico do fígado (6µm) de ratos *Wistar* machos do grupo ADX não infectado (ADXNI). Hematoxilina e eosina (400x).

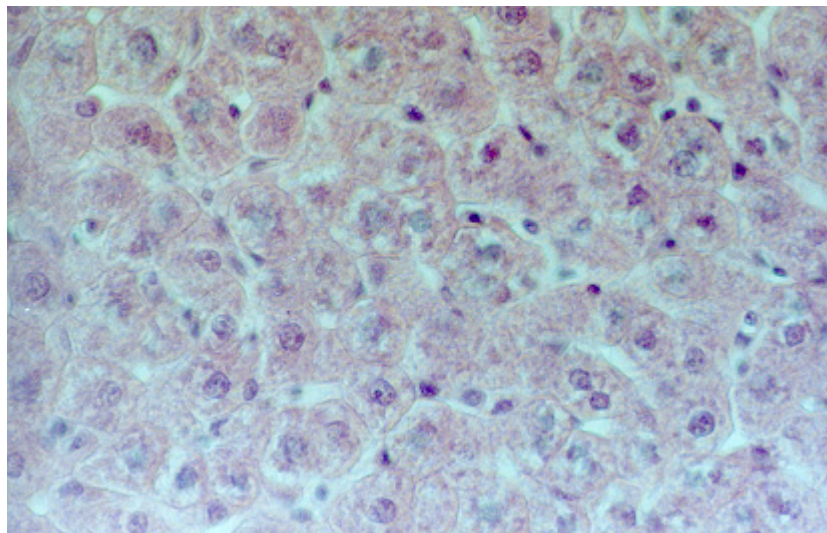


Figura 22. Corte histológico do fígado (6 μ m) de ratos *Wistar* machos do grupo ADX infectado (ADX1). Hematoxilina e eosina (400x).

6.4.4.3.4 Grupo A+D sem infecção e infectado

Tanto o grupo A+D sem infecção como o grupo A+D infectado apresentou células hepáticas com núcleos bastante alterados, citoplasma irregular e infiltrado inflamatório. Porém, não foi observada presença de ninhos de amastigotas.

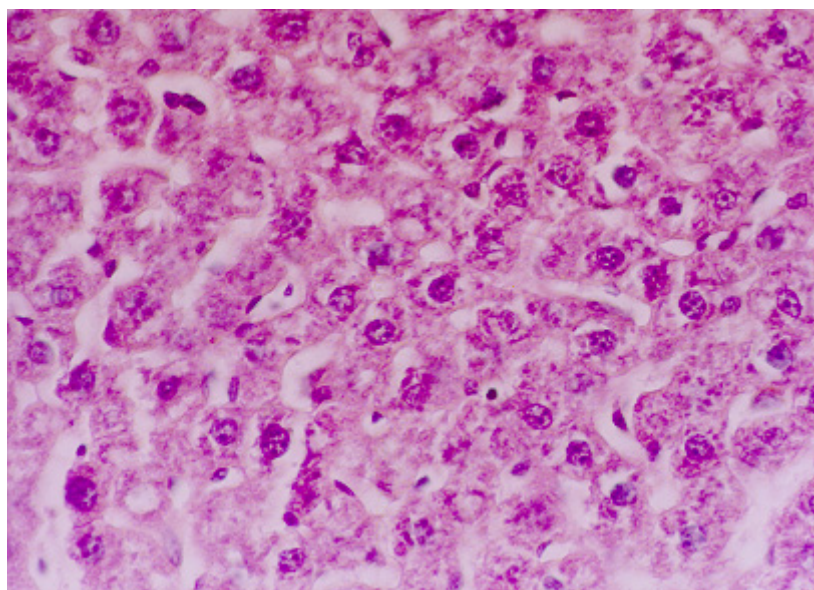


Figura 23. Corte histológico do fígado (6µm) de ratos *Wistar* machos do grupo A+D não infectado (A+DNI). Hematoxilina e eosina (400x).

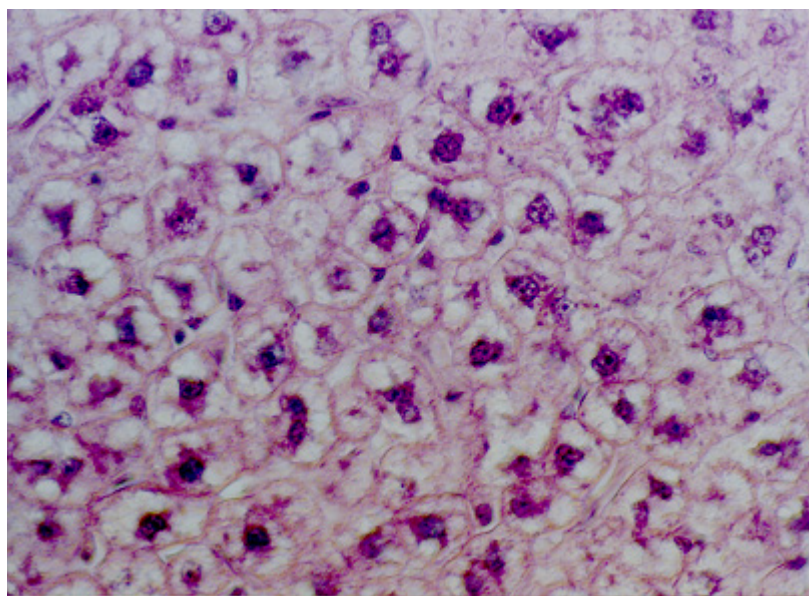


Figura 24. Corte histológico do fígado (6 μ m) de ratos *Wistar* machos do grupo A+D infectado (A+DI). Hematoxilina e eosina (400x).

6.4.4.4 Análise Histopatológica do timo

6.4.4.4.1 Grupo Controle sem infecção e infectado

No grupo Controle sem infecção observou-se aspecto normal dos timócitos, com delimitação visível, tanto da zona cortical quanto da zona medular. O grupo Controle infectado, nota-se desorganização entre as duas zonas, com timócitos dispersos e sem presença de ninhos de amastigotas.

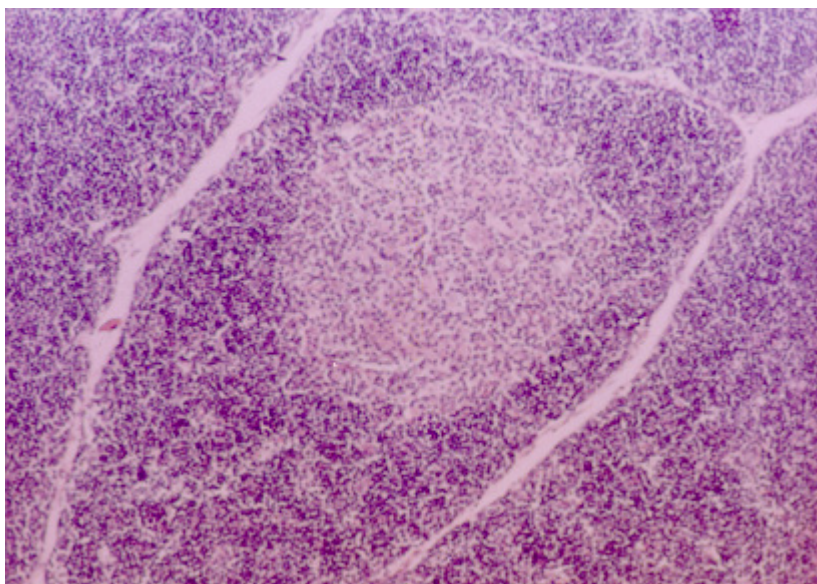


Figura 25. Corte histológico do timo (6 μ m) de ratos *Wistar* machos do grupo Controle não infectado (CNI). Hematoxilina e eosina (100x).

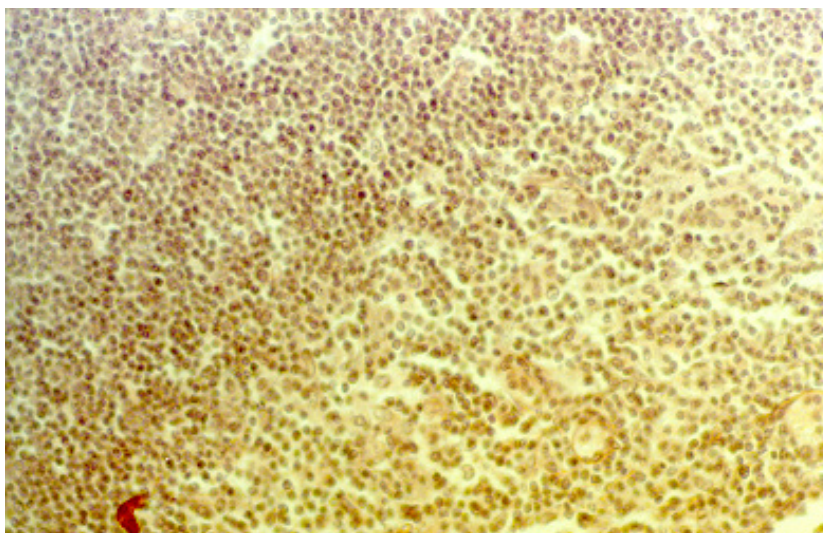


Figura 26. Corte histológico do timo (6µm) de ratos *Wistar* machos do grupo Controle infectado (CI). Hematoxilina e eosina (250x).

6.4.4.4.2 Grupo Sham sem infecção e infectado

No grupo Sham sem infecção observou-se aspecto normal dos timócitos, com delimitação visível, tanto da zona cortical quanto da zona medular. O grupo Sham infectado, verificou-se descaracterização morfológica das duas zonas, com timócitos dispersos; porém, não foi observada a presença de ninhos de amastigotas.

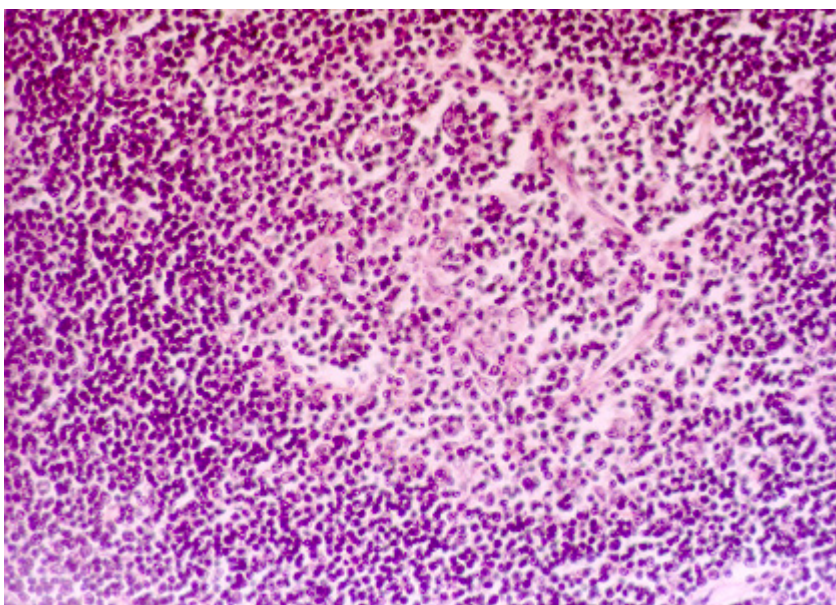


Figura 27. Corte histológico do timo (6 μ m) de ratos *Wistar* machos do grupo Sham não infectado (SHNI). Hematoxilina e eosina (100x).

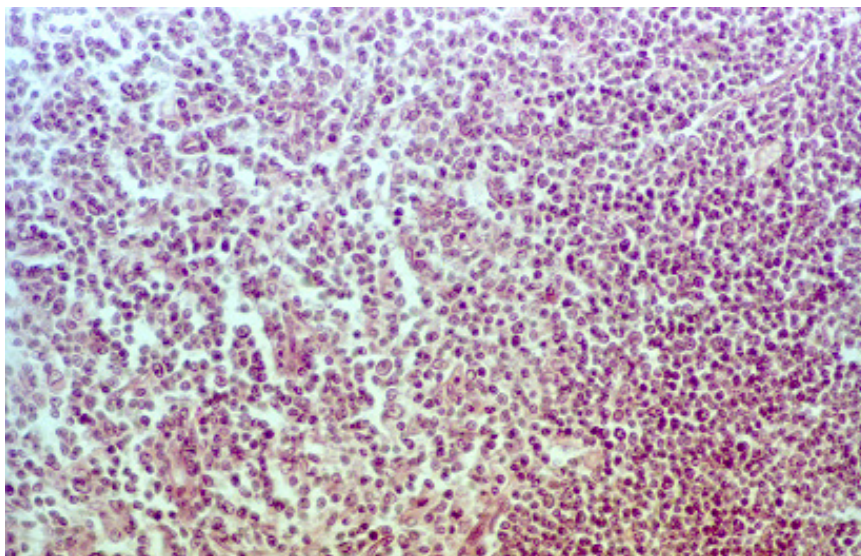


Figura 28. Corte histológico do timo (6 μ m) de ratos *Wistar* machos do grupo Sham infectado (SHI). Hematoxilina e eosina (250x).

6.4.4.4.3 Grupo ADX sem infecção e infectado

No grupo ADX sem infecção verificou-se aspecto normal dos timócitos, podendo visualizar tanto a zona cortical quanto a zona medular. Já o grupo ADX infectado, ocorreu grande desorganização morfológica as duas zonas, com timócitos dispersos e sem presença de ninhos de amastigotas.

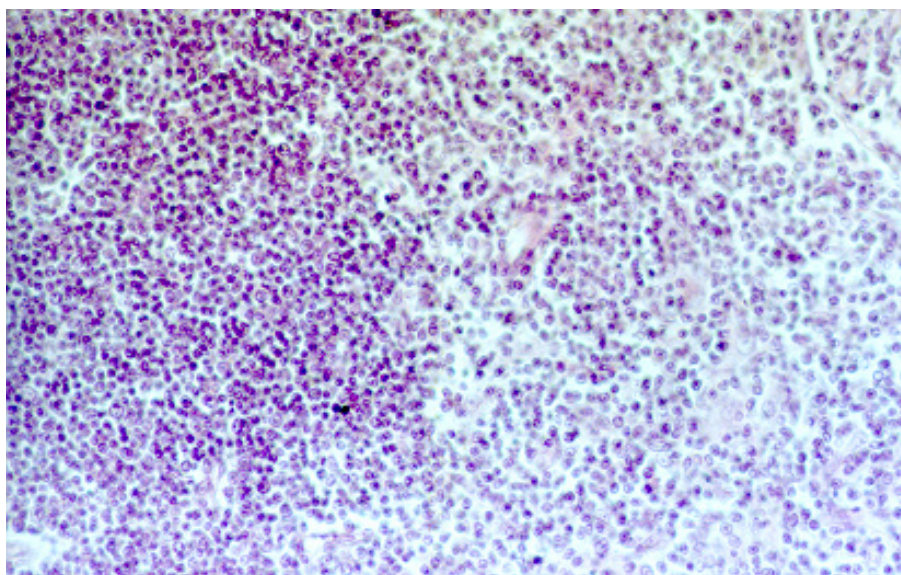


Figura 29. Corte histológico do timo (6 μ m) de ratos *Wistar* machos do grupo ADX não infectado (ADXNI). Hematoxilina e eosina (250x).

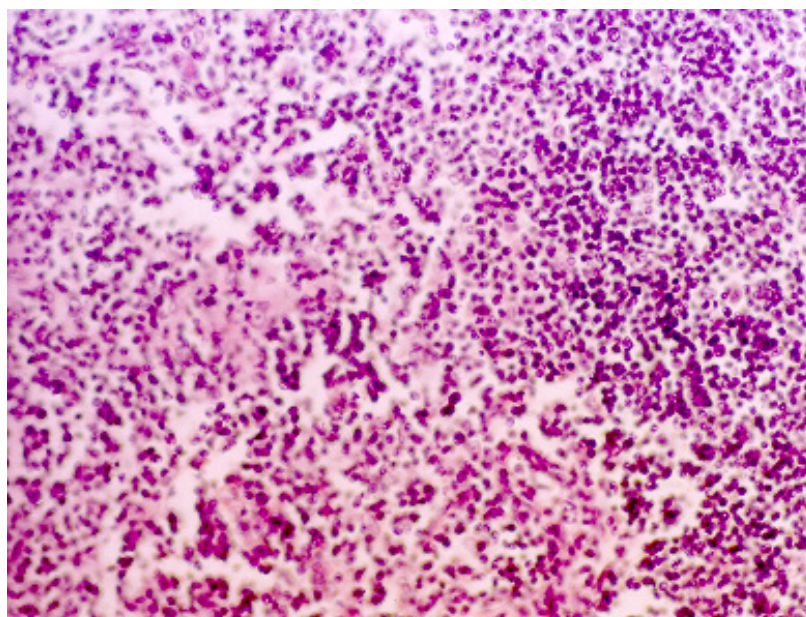


Figura 30. Corte histológico do timo (6 μ m) de ratos *Wistar* machos do grupo ADX infectado (ADXNI). Hematoxilina e eosina (250x).

6.4.4.4 Grupo A+D sem infecção e infectado

No grupo A+D sem infecção observou-se aspecto normal dos timócitos, porém, com pouca visibilidade na delimitação das zonas cortical e medular. Já o grupo A+D infectado, notou-se relevante desorganização morfológica das duas zonas, com timócitos dispersos e irregulares. Porém, não foi observada presença de ninhos de amastigotas.

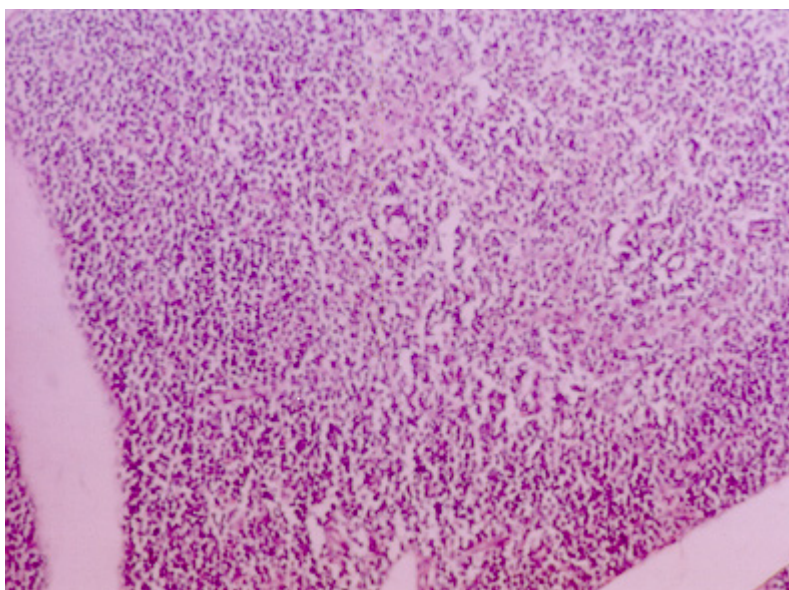


Figura 31. Corte histológico do timo (6 μ m) de ratos *Wistar* machos do grupo A+D não infectado (A+DNI). Hematoxilina e eosina (100x).

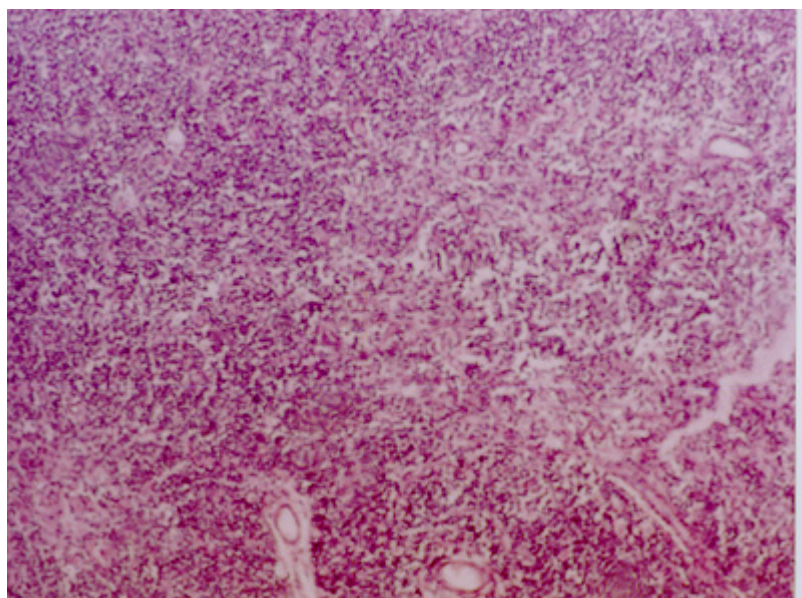


Figura 32. Corte histológico do timo (6 μ m) de ratos *Wistar* machos do grupo A+D infectado (A+DI). Hematoxilina e eosina (250x).

A análise morfológica do coração dos grupos não infectados, não apresentou alterações teciduais, mantendo o aspecto histológico normal. Porém, o coração dos grupos infectados, apresentou ninhos de amastigotas bem definidos, com fibras cardíacas dispersas e vários pontos de infiltrado inflamatório. Estes dados permitem dizer que o coração foi o órgão mais atingido durante a infecção e que teve maiores alterações morfológicas, dados estes, que foram comprovados com a cariometria, coincidindo também com os dados da literatura.

Para os grupos sem infecção, o baço apresentou células esplênicas e folículos linfóides histologicamente normais. Já os grupos infectados, mesmo não sendo encontrado ninhos de amastigotas, apresentaram processo inflamatório, e uma maior ativação dos folículos linfóides, alguns ligeiramente atrofiados e com núcleos disformes, indicando que a infecção, a ausência do hormônio e a reposição de dexamatasona influenciaram na anatomia do órgão.

As observações do fígado dos grupos não infectados, apresentaram alterações morfológicas aparentes para o grupo A+D, devido, possivelmente, ao estresse da operação, a ausência do hormônio e a reposição de dexamatasona, modificando o formato das células. Já os grupos infectados tiveram alterações das células hepáticas, com núcleos mais atrofiados, desorganização morfológica, com a de infiltrado inflamatório, porém sem a presença de ninhos de amastigotas teciduais. A ausência desses ninhos pode estar relacionada com a função da carga parasitária e com a resistência oferecida pelo hospedeiro. Segundo NUNES, et al., 1992, descrevem que o acometimento do fígado depende da carga parasitária e do tipo da cepa de *T.cruzi*. Já BRENER et al., 2000 relata que em outros modelos experimentais como os

camundongos, o parasitismo hepático é escasso. Em suma, estudos sugerem que as lesões de natureza inflamatória e degenerativa da fase aguda não apresentam caráter evolutivo, e que as funções hepáticas se encontram pouco alteradas na fase crônica da doença de Chagas (BRENER et al., 2000).

Ao verificar o timo, notou-se que os animais não infectados, não apresentaram alterações relevantes. Entretanto, os grupos infectados tiveram modificações importantes, devido à diminuição da zona cortical e aparente desorganização da zona medular, principalmente no grupo A+DI. Os resultados estão de acordo com as descrições feitas por LEITE DE MORAES et al., (1992), que relatam que animais infectados com 10^6 parasitas da cepa CL, na fase aguda da infecção, desenvolvem uma atrofia progressiva com morte celular na área cortical do timo, resultando em importantes alterações tanto em número como em porcentagem das subpopulações de células CD4, CD8 e CD3, levando gradativamente os animais a um estado de imunossupressão.

Segundo ABBAS et al, (1994) e ROITT et al., (1996), relatam que existe uma diferença entre os tipos de populações celulares nas respectivas áreas do timo. Assim, na região cortical há uma quantidade muito grande de células T imaturas e na medula células mais maduras. Os timócitos imaturos chegam até a zona medular, onde estas células começam a expressar receptores para antígenos ou marcadores de superfície.

No grupo A+D, ocorreu alterações morfológicas visivelmente relevantes entre a zona cortical e medular tanto para animais infectados como não infectados, sugerindo que a dexametasona tenha interferido no processo de divisão celular dos

timócitos, diminuindo o tamanho do órgão e decrescendo a população de células maduras, associada à ação do parasita.

7. Conclusões Gerais

Pode-se concluir de maneira geral:

- A retirada dos hormônios produzidos pelas glândulas adrenais, mediante adrenalectomia, não causou alterações importantes na resposta imune durante a evolução da tripanosomíase experimental em ratos *Wistar*.
- No hemograma os resultados obtidos não apresentaram modificações relevantes quanto às funções e a produção das células vermelhas e brancas no organismo. Somente o grupo A+D obteve uma discreta policitemia, estatisticamente não significativa, quando comparados aos demais grupos.
- Quanto à produção de óxido nítrico (NO), tanto em macrófagos do peritônio quanto do baço, pode-se concluir que a adrenalectomia e a reposição de dexamatasona, não modificaram a evolução da resposta imune na tripanosomíase experimental, pois os resultados obtidos não foram significativos para detectar alterações relevantes. .
- Analisando a histopatologia, os resultados mostraram que houve a presença de grande quantidade de ninhos de amastigota somente no coração, principalmente no 9º dia de infecção, coincidindo com o pico parasitário. Os outros órgãos não apresentaram ninhos, porém, tiveram alterações em seus núcleos, fato que foi confirmado mediante a cariometria, e presença de infiltrado inflamatório. Com isso, verificou-se que a ausência do hormônio e a reposição de dexamatasona devem ter influenciado no processo de infecção.

- A cariometria apresentou alterações significativas, dependendo do tipo de órgão e dos grupos que foram comparados. As maiores alterações ocorreram nos grupos adrenalectomizados com ou sem reposição de dexametasona infectados, onde se presenciou núcleos disformes, indicando que os hormônios são importantes para manter as funções das células.

8. BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H. & POBER, J.S. *Imunologia celular & molecular*. 3º ed. Editora Revinter, São Paulo, SP, 2000.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara-Koogan, 2000.

ALCÂNTARA, A. & BRENER, Z. The in vitro interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. **Acta Trop.** v. 35, p. 209-19, 1978.

ALCINA, A. & FRESNO, M. Activation by synergism between endotoxin and lymphokines of mouse cell line J774 against infection by *Trypanosoma cruzi*. **Paras. Imm.** v. 9, p. 175-86, 1987.

ALIBERTI, J.C.S., CARDOSO, M.A.A.G. MARTINS, G.A., GAZZINELI, R.T., VIEIRA, L.Q. & SILVA, J.S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.** v. 64, p. 1961-67, 1996.

ALIBERTI, J.C.S., machado, F.S., SOUTO, J.T., CAMPANELLI, A.P., TEIXEIRA, M.M., GAZZINELI, R.T. & SILVA, J.T. Beta-chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.** v. 67, p. 4819-26, 1999.

ALMENARA, G. Las alteraciones histológicas del hígado en los casos agudos de enfermedad de Chagas. *Tese*. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina, 1920.

ALVARENGA, R.J. Lesões hepáticas na fase aguda da doença de Chagas experimental em camundongos. *Tese*. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da Universidade de Minas Gerais, 1960.

AMATO NETO, V. Tratamento da Doença de Chagas. **Rev. Med.** v. 64(1), p.10-4, 1986.

ANDREWS, N.W. & WHITLOW, M. B. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. **Mol.Biochem.Parasitology**. v. 33, p. 249-56, 1989.

ANDRADE, S.G.; CARVALHO, M.L. & FIGUEIRA, R.M. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Gaz.Med. Bahia**, v.70, p.32-42, 1970.

ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no recôncavo baiano. **Rev.Patol.Trop**. v.3, p.65-121, 1974.

ANDRADE, S.G. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strain in some types. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v. 18, p. 140-1, 1976.

ANDRADE, Z.A., ANDRADE, S.G., OLIVEIRA, G.B. & ALONSO, D.R. Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis. **Am.Heart.J.** v. 93, p. 316-24, 1978.

ARCHER, R.K., JEFFCOTT, L.B. & LECHMANN, H. Comparative clinical haematology. Oxford, Blackwell, 1977.

BACH, J.F. **Imunologia**. 2^o ed.; Editora Guanabara Koogan, RJ, 1982.

BARRETO, M.P. Reservatórios de *Trypanosoma cruzi* nas Américas. **Rev. Bras. Malariol. Doença Trop.** v.16, n.1, p.527-52, 1964.

BARRETO, P.C.A. & IANNI, M.B. A forma indeterminada da moléstia de Chagas: conceito e implicações médico-legais. **Rev. Soc. Cardiol. SP**, v.4(2), p.129-32, 1994.

BESEDOVSKY, H.; REY, A.D.; SORKIN, E. & DINARELLO, C.A. Immunoregulatory Feedback Between Interleukin-1 and Glucocorticoid Hormones. **Science**. v.233, p.652-4, 1986.

BORGES, M.M.; MELLO, D.A. & TEIXEIRA, M.L. Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) com *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Saúde Pública**. v.16, p.233-42, 1982.

BORGES, M.M.; ANDRADE, S.G.; PILATTI, C.G.; PRADO JR., J.C. & KLOETZEL, J.K. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and Swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz**, v.87, p.493-502, 1992a.

BORGES, M.M.; CURI, P.R. & KLOETZEL, J.K. Modulation of parasitemia and antibody response to *Trypanosoma cruzi* by cyclophosphamide in *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae). **Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo**, v.34, p.1-8, 1992b.

BRECHER, G. & CRONKITE, E.P. Morphology and enumeration of human blood platelets. **J.Appl.Physiol.** v.3, p.365-77, 1950.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo**. v.4, p.389-96, 1962.

BRENER, Z. & CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo**. v.5, p.220-224, 1963.

BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Ann.Trop. Parasitol.** v.59, p.19-26, 1965.

BRENER, Z. O parasito: relações hospedeiro-parasito. In. Brener Z., Andrade, Z. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan. p.41, 1969.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A. & BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas.**, 2^o ed.; Editora Guanabara Koogan, RJ, p.55-6, 2000.

BRUMPT, E. *Schizotrypanum cruzi* – différentes phases de son cycle évolutif. **Bull.Soc.Pathol.Exot.** v. 5, p. 261-2, 1912.

CALDEIRA, J. C. & FRANCI, C.R. Prolactin and Corticosterone secretion in response to acute stress after paraventricular nucleus lesion by ibopotent acid. **Brain Research Bulletin**, v.52, p.483-489, 2000.

CALIARI, M.V., LANA, M. OLIVEIRA, E.R., BARBOSA, A.J.A. & TAFURI, W.I. Immunocytochemical study of tissue parasitism of dog adrenal glands in experimental Chagas disease. **Parasite**. p. 397-400, 1994.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G. & SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by Gamma Interferon and Interleukin 10: Role of NK Cells. **Infection and Immunity**. v.64, p.128-34, 1996.

CASTRO, M.A.P. & BRENER, Z. Estudo parasitológico e anátomo-patológico da fase aguda da doença de Chagas em cães inoculados com duas diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Rev.Soc.Bras.Med.Trop.** v. 36, p. 233-239, 1985.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de uma nova entidade mórbida para o homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.1, p.159-218, 1909.

CHAGAS, E. Infection expérimental de l'home par le *Trypanosoma cruzi*. **C.R.Seances Soc.Biol.Fil.** v.115, p.1339-41, 1933.

CHAPADEIRO, E.; BERALDO, P.S.S.; JESUS, P.C.; OLIVEIRA JR., W.P. & JUNQUEIRA JR, L.F. Lesões cardíacas em ratos *Wistar* inoculados com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Rev.Soc.Bras.Med.Trop.** v. 21, p. 95-103, 1988.

CHADRASEKAR, B.; MELBY, P.C.; TRYER, D.A.; COLSTON, J.T. & FREEMAN, G.L. Temporal Expression of Pro-Inflammatory Cytokines and Inducible Nitric Oxide Synthase in experimental acute Chagasic Cardiomyopathy. **Am. J. Pathol.** V. 152, p. 925-34, 1998.

CHROUSOS, G. P. & GOLD P. W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis, **JAMA.** v.267, p.1244, 1992.

CLARK, C. G.; PUNG, O. J. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *T.cruzi* from North America. **Mol.Biochem.Parasitol.** v.66, n.1, p.175-79, 1994.

CIMO, P. L., LUPER, W. E., SCOUROS, M. A. Transfusion – associated Chagas' disease in Texas: report of a case. **Tex.Med.**, v. 89, n. 12, p. 48-50, 1993.

COSSIO, P.M., DAMILIANO, G. de La, VEJA, M.T., LAGUENS, R.P., MERKERT, P.C., DIEZ, C. & ARANA, R.M. In vitro interaction between lymphocytes of chagasic individuals and heart tissue. **Medicina** (Buenos Aires). v.36, p. 287-93, 1976.

COURA, J.R. Doença de Chagas como endemia urbana. In. Cardiopatia chagásica. Cançado, J.R., Chuster, M. Belo Horizonte Fundação Carlos Chagas, p. 356-63, 1985.

CUNHA, D.F., VIEIRA, S.G.P., ERÉDIA, G.R. & TEIXEIRA, V.P.A. Reação da fase aguda do parasitismo na veia central da supra renal de chagásicos crônicos. **Rev.Soc. Bra.Med.Trop.** v. 27(2), p. 83-86, 1994.

DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. **Practical haematology**, 6^a ed. Edinburg, Churchill Livingstone, p.453. 1984.

DIAS, J. C. P., COURA, J. R. Epidemiologia. Em: Dias, JCP, Coura, JR (eds). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ Editora, p. 33-66, 1997.

DIAS, J.C.P. Mecanismos de transmissão. In. Brener Z., Andrade, Z.A. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.** Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, cap.4, p.152-74, 1979.

DOST, C.K., ALBUQUERQUE, S., HEMLEBEN, V. ENGELS, W. & PRADO JR, J.C. Molecular genetic characterization of different *Trypanosoma cruzi* strains and comparison of their development in *Mus musculus* and *Calomys callosus*. **Parasitol. Res.** DOI 10.1007/s00436-001-0553-8, 2002.

DOUGHERTY, T. F. & WHITE, A. Influence of hormones on lymphoid tissue structure and function: role of pituitary adrenotrophic hormone in regulation of lymphocytes and other cellular elements of the blood. **Endocrinology.** v. 35, p. 1-14, 1944.

DOUGHERTY, T. F. & WHITE, A. Evaluation of alterations produced in lymphoid tissue by pituitary adrenal cortical secretion. **J. Lab. Clin. Med.** v. 32, p. 584-605, 1947.

DRABKIN, D.L. & AUSTIN, J.H. Spectrophotometric studies: spectometric constants for common haemoglobin derivatives. **J.Biol. Chem.** v. 98, p. 719-33, 1932.

EIDINGER, D. & GARRET, T. Studies of regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. **J. Exp. Med.** v.136, p. 1098-116, 1972.

FANTUZZI, G., DEMITRI, M.T. & GHEZZI, P. Differential effect of glucocorticoids on tumour necrosis factor production in mice: up-regulation by early pretreatment with dexamethasone. **Clin. Exp. Immunol.** v. 96, p. 166-69, 1994.

FERRAZ, A. S.; FIGUEIREDO, J. L. Transmision of Chagas' disease through transplanted kidney: ocurrence of the acute form of the disease in two recipients from the same donor. **Rev.Inst.Med.Trop.** SP, v.35, n.5, p. 461-63, 1993.

GARCIA E.S. & DVORAK, J.A. Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. **Am.J.Trop.Med.Hyg.** v. 31, n.2, p.259-62, 1982.

GARCIA, S.B.; PAULA, J.S.; GIOVANNETTI, G.S.; ZENHA, F.; RAMALHO, E.M.; ZUCOLOTO, S.; SILVA, J.S. & CUNHA, F.Q. Nitric Oxide is involved in the lesions of the Peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp. Parasitol.** v. 93, p. 191-7, 1999.

GATLEY, M. K. & MULQUEEN, M. J. Interleukin 12: Poencial clinical applications in the treatment and prevention of infeccious diseases. **Drugs.** v.52, p.18-26, 1996.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S.L. & SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide mediated mechanism inhabitable by interleukin-10 and transforming grow factor-beta. **Eur. J. Immunol.** v.22, p.2501-2506, 1992.

GIVALOIS, L., LI, S. & PELLETIER, G. Central nitric oxide regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenacortical axis in adult male rats. **Mol.Brain.Research.** v. 102, p. 1-8, 2002.

GOLDEN, J.M. & TARLETON, R.L. *Trypanosoma cruzi*: Cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. **Exp. Parasitol.** v. 72, p. 391-402, 1991.

GONÇALVES NETO, J.F. Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade biológica dos derivados da N-aminometilftalimida sobre *Trypanosoma cruzi*. Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Parasitologia da UNICAMP – Campinas), 2002.

GOODMAN, L.S., GILMAN, A.G. & GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 6^o ed, v. 2, Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1983.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S. & TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochemistry.** v.126, p.131-8, 1982.

GROSSMANN, C.J. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. **Science.** v.227, p.257-61, 1985.

HEVEL, J.M.; WHITE, K.A. & MARLETTA, M.A. Purification of inducible murine macrophage nitric oxide synthase: identification as flavoprotein. **J. Biol. Biochem.** v. 266, p. 2789-91, 1991.

HIRANO, T.; AKIRA, S.; TAGA, T. & KISHIMOTO, T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. **Immunol. Today**, v.11, p.443, 1990.

HRUBY, Z. & BECK K.F. Cytotoxic effect of autocrine and macrophages – derived nitrite oxide on cultured rat mesangial cell. **Clin. Exp. Immunol.** v. 107, p. 76-82, 1997.

HOARE, C.A. The tripanosomes of mamals. Oxford, Blackwell Sci., p.749, 1972.

IKEDE, B.O., LULE, M. & TERRY, R.J. Anemia in trypanosomiasis: mechanisms of erythrocyte destruction in mice infected with *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei*. **Acta.Trop.** v. 34, p. 53-60, 1977.

JANEWAY, A. C. Imunobiologia - o sistema imunológico na saúde e na doença. 2000, 4º ed. Editora Artmend, Porto Alegre, RS.

KELLY, R.A.; BALLIGAND, J.L. & SMITH, T. Nitric Oxide and cardiac function. **Circ. Res.** v. 79, p. 363-80, 1996.

KIERSZENBAUM, F. Chronic Chagasic tissue lesions in the absence of *T.cruzi*: a proposed mechanism. **Parasitol Today**. v.12(11), p. 414-15, 1996.

KIERSZENBAUM, F. & HOWARD, J.D. Mechanism of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection; the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. **J. Immunol.** v. 116, p.755-766, 1976.

KIERSZENBAUM, F. Chronic Chagasic tissue lesions in the absence of *T.cruzi*: a proposed mechanism. **Parasitol Today**. V. 12(11), p. 414-15, 1996.

KIRCHHOF, L.V. *Trypanosoma* species (American trypanosomiasis, Chagas Disease): Biology of trypanosomes. Principles and practice of infectious diseases, Churchill Livingstone, New York, 4 ed. 2442-2450, 1995.

KLOETZEL, J.K., MILDER, R. & UMEZAWA, E.S. *Trypanosoma cruzi* interaction with macrophages: differences between tissue culture and bloodstream forms. **Rev. Inst. Med. Trop. SP.** v. 26, p. 179-85, 1984.

KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. **J. Immunol.** v.116, p.755-60, 1976.

KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **J. Immunol.** v. 128, p.2009-2012, 1982.

LEITE DE MORAES, M.C., HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M; DARDENNE, M. & SAVINO, W. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology.** v. 77, p. 95-8, 1992.

LEVINE, N.D. (Chairman), CORLISS, J.O., COX, F.E.G., DEFOUX, J.G., HONIGBERG, B.M., LEEDALE, G.F., LOEBLICH, A.R., LOM, J., LINN, D., MERINFELD, E.G., PAGE, F.C., POLJANSKY, G., VARA, J. & WALLACE, F.G.A. Newly revised classification of the Protozoa. **L. Protozool.** v.27, p. 37-58, 1980.

LIAO, J.; KEISER, J. A.; SCALES, W. E.; KUNKEL, S. L. & KLUGER, M. J. Role of epinephrine in TNF and IL-6 production from isolated perfused rat liver. **Am.J. Physiol.**, v. 268, p. 896, 1995.

LOPES, E.R., CHAPADEIRO, E., TARUFI, W.K. & PRATA A.R. Doença de Chagas In. Bogliolo. Patologia, 5d. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan v. 33, p.1103 –1124, 1994.

LORSBACH, R.B.; MURPHY, W.J.; LOWENSTEIN, C.J.; SNYDER, S.H. & RUSSELL, S.W. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 1908-13, 1993.

MACHADO F.S.; MARTINS, G.A.; ALIBERTI, J.C.S.; MESTRINER, F.L.A.C.; CUNHA, F.Q. & SILVA, J.S. *Trypanosoma cruzi*- Infected Cardiomyocytes produce Chemokines and Cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Am. Heart Assoc.** v. 102, p. 3003-8, 2000.

MACKANESS, G.B. The influence of immunologically committed lymphoid cell on macrophage activity *in vivo*. **J. Exp. Med.** v.129, p. 973-8, 1969.

MADY, C. & NACRUTH, R. Natural of chronic Chaga's heart disease: prognosis factors. **Medical Journal.** v. 113, p. 791-6, 1995.

MARTINS, G.A.; CARDOSO, M.A.G.; ALIBERTI, J.C.S. & SILVA, J.S. Nitric Oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infections in mice. **Imm. Letters.** v. 63, p. 113-20, 1998.

MASTORAKOS, G.; BAMBERGER, C & CHROUSOS, P.G. Neuroendocrine Regulation of the Immune Process. In: PLOTNIKOFF, N. P., FAITH, R. E., MURGO, A.J. & GOOD, R.A. Cytokines Stress and Immunity. CRC Press LLC USA, p.17-37, 1999.

MELO, R.C. & BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J.Parasitol.** v.64, n.3, p.475-82, 1978.

MERCADO. M.; QUAN, N.; PADGETT, D. A., SHERIDAN, J. F. & MARUCHA, P. T. "Restraint stress alters the expression of interleukin-1 and keratinocyte growth factor at

the wound site: an in situ hybridization study." **J.Neuroimmunol** v. 129(1-2), p. 74-83, 2002.

MILDER, R., KLOETZEL, J.K. & DEANE, M.P. Observation on the interaction of peritoneal macrophages with *T. cruzi*: II. Intracellular fate of bloodstream forms. **Rev. Inst.Med.Trop.** v. 19, p. 313-22, 1977.

MILES, M.A., LANHAM, S.M., SOUZA, A.A. & POVOA, M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 74,p. 221-37, 1980.

MILLER, G. E.; COHEN, S. & RITCHEY, A. K. "Chronic psychological stress and the regulation of pro-inflammatory cytokines: a glucocorticoid-resistance model." **Health Psychol.** v.21 (6), p.531-41, 2002.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J. & HIGGS, E.A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology of Nitric Oxide. **Pharmac. Rev.** v.43, p.109-242, 1991.

MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 94, p.401-4, Suplemento1, 1999.

MOORE, K.L. **Anatomia orientada para a clínica.** 3º ed, 1992.

MURRAY, H.W., SPITALNY, G.L. & NATHAN, C.T. Action of mouse peritoneal macrophages in vivo and in vitro by interferon-gamma. **J.Imm.** v. 146, p. 3591-8, 1985.

NATHAN, C. NOGUEIRA, N., JUANGBHANICH, C., ELLIS, J. & COHN, Z. Activation of macrofages in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *T.cruzi*. **J. Exp. Med.** v. 149, p.1056-68, 1979.

NATHAN, C. F. Nitric Oxide as a secretory product of mamalian cells. **Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.** v. 6, p. 3051-64, 1992.

NELSON, R.J. An Introduction to Behavioral Endocrinology. 2^o ed, Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, 2000.

NEVES, D.P., MELO, A.L., GENARO, O. & LINARDI, P.M. Parasitologia Humana. 10^o ed., Ed. Atheneu, SP, 2000.

NOGUEIRA, N., GORDON, S. & COHN, Z.A. *Trypanosoma cruzi*: modification of macrophages function during infection. **J.Exp. Med.** v. 146, p. 157-71, 1977.

NOGUEIRA, N., CHAPLAN, S. & COHN, Z.A. *Trypanosoma cruzi*: factors modifying ingestion and fate of blood form trypomastigotes. **J.Exp.Med.** v. 152, p. 447-51, 1980.

NORRIS, K.A.; SCHRIMPF, J.E.; FLYNN, J.L. & NORRIS JR, S.M. Enhancement of macrophage microbicidal activity: supplemental Arginine and Citrulline augment Nitrix Oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. **Infec. Imm.** p. 2793-6, 1995.

NUNES, M.P., SOBRAL, A.C. & COUTINHO, S.G. Quantification of *Trypanosoma cruzi* in the heart, lymph nodes and liver of experimentally infected mice, using limiting diluting analysis. **Men. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 87, p.503-9, 1992.

OLIVEIRA FERREIRA, H. Forma aguda da Doença de Chagas. In. Doença de Chagas. Ed. J.R.Cançado. Belo Horizonte, Imprensa Oficial, p. 359, 1968.

OLIVEIRA, J. S. M., MELO de OLIVEIRA, J. A., FREDERIQUE, J. R. V. & LIMA, F. D. C. Apical aneurysm of Chaga's heart disease. **Br. Heart J.** v. 46, p. 432-7,1981.

PALMER, R.M.J.; ASHTON, D.S. & MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**. v. 333, p. 664-6, 1988.

PEREIRA BARRETO M.P. Epidemiologia. In. Brener Z., Andrade Z. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan. 89-151, 1979.

PESSOA, S.B. & MARTINS, A.V. Parasitologia Médica. 10 ed, Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1977.

PESSOA, S.B., MARTINS, A.V. Parasitologia Médica. 11^a ed., Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1990.

PETRAY, P.; ROTEMBERG, M.E.; GRINSTEIN, S. & ÖRN, A. Release of Nitric Oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Imm.** v. 16, p. 193-9, 1994.

PINHEIRO-CHAGAS, C. Lesões hepáticas na moléstia de Chagas. Tese. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina, 1920.

PLATA, F., WIETZERBIN, J., GARCIA-PONS, F., FALCOFF, E. & EISEN, H. Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Eur. J. Immunol.** v. 14, p. 903-5, 1984.

PLATA, F., GARCIA-PONS, F. & WIETZERBIN, J. Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. **Ann. Inst. Pasteur.** v. 138, p. 397-45, 1987.

PRADO, J.C.J.; LEAL, M.P.; FRANCI, J.A.A.; ANDRADE, H.F.J. & KLOETZEL, J.K. Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Calomys callosus*

infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol.Res.** v.84, n.2, p.100-05, 1998.

PRADO, J.C.J.; LEVY, A.M.A., LEAL, M.P., BERNARD, E. & KLOETZEL, J.K. Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol.Res.** v.85, p.826-29, 1999.

RASSI, C. Clínica. Fase Aguda. In. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In. Brener, Z, Andrade, Z.A., Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, p. 248-64, 1979.

RASSI, A. & TRANCHESI, B. Doença de Chagas. In. Foccacia R., Dietze R. Doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara-Koogan, 674-705, 1991.

REGELSON, W.; LORIA, R. & KALIMI, M. "Dehydroepiandrosterone (DHEA)-the "mother steroid". I. Immunologic action." **Ann N Y Acad Sci.** v.719, p. 553-63, 1994.

RIBEIRO, R.D., FILHO, F.F. & NETO, F.M.B. Comportamento de subamostras do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros vertebrados e invertebrados. **Rev.Brasol.Biol.** v.42, RJ. p. 51-4, 1982.

RIVIER, C. & VALE, W. Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. **Nature.** v.305, p. 325-27, 1983.

ROITT, I.; BROSTOFF, J. & MALE, D. Immunology. 1996, 4^o ed. Editora Barcelona, Mosby.

RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; MINOPRIO, P.; COUTINHO, A. & HOTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in

Trypanosoma cruzi – infected mice after inactivation of helper T cell. **Ann. Inst. Pasteur Immunol.** v. 139, p. 225-36, 1988.

SALA, M.A.; KOMESU, M.C.; LOPES, R.A. & MAIA CAMPOS, G. Karyometric study of basal cell carcinoma. **Braz.Dent.J.** v.5(1), p. 11-14, 1994.

SALVEMINI, J.M. & MOLLACE, V. Roles and therapeutic implications of nitric oxide in the cardiovascular system. **DN&P.** v. 7, p. 158-66, 1994.

SALTZMAN, B.E. Colorimetric microdetermination of nitrogen dioxide in the atmosphere. **Anal Chemis.** v.26, p.1949-55, 1954.

SAPOLSKY, R.; RIVIER, C.; YAMAMOTO, G.; PLOTSKY, P. & VALE, W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin releasing factor. **Science.** v.238, p.522, 1987.

SATELLITE MEETING. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz.** v.94,, supl.1, p. 429-32, 1999.

SCHENONE, H., IGESIAS, J., SCHENINE, S. & CONTRERAS, M.C. Infección chagásica congénita de segunda generación. **Bol. Chil. Parasitol.** v. 42, n.3/4, p.71-3, 1987.

SCORZA, C. & SCORZA, J.V. Acute myocarditis in rats inoculated with *Trypanosoma cruzi*: study of animals sacrificed between the fourth and twenty - ninth day after inoculation. **Rev.Inst.Med.Trop.** v.14, p.171-177, 1972.

SIEGEL, S. Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, 1975.

SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **FolhaClínicaBiol. São Paulo**, v.20, p.191-201, 1953.

SILVA, J.C., MORRISON, K.H., GRABSTEIN, K.H., MOHLER, K.M., ANDERSON, D., & REED, S.G. Interleukin-10 and Interferon-gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.** v. 175, p. 169-74, 1992.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; CORRÊA, A.D. & HUGGINS, D.W. **Moléstia de Chagas**. Editora Cultura Médica, 1996.

SOGAYAR, R.; KIPNIS, T.L. & CURI, P.R. A critical evaluation of the expression of parasitaemia in experimental Chagas disease. **Rev.Inst.Med.Trop.** v. 35 (5), p. 395-8, 1993.

SOUTO, R.P., FERNANDES, O., MACEDO, A.M., CAMPBELL, D.A. & ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Bioch. Parasitol.** v. 83, p. 141-52, 1996.

STAMLER, J.S.; SINGEL, D.J. & LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science.** v. 258, p. 1898-902, 1992.

SZTEIN, M.B. & KIERSZENBAUM, F. Mechanisms of development of immunosuppression during *Trypanosoma* infection. **Parasitol.Today.** v.9, p.424-8, 1993.

TALIAFERRO, W.H. & PIZZI, T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *trypanosoma cruzi*. **J.Infect. Dis.** v.96, p. 199-205, 1955.

TARLETON, R.L. Depletion of CD8⁺ T cell increases susceptibility and vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** v. 144, p. 717-24, 1990.

TERENZI, F., DIAZ-GUERRA, M.J.M., CASADO, M., HORTERLANO, S., LEONI, S. & BOSCA, L. Bacterial Lipopeptides Induce Nitric Oxide Synthase and promote apoptosis through Nitric Oxide – independent pathways in rat macrophages. **J.Biol.Chemistry.** v.270 (11), p. 6017-21, 1995.

TITTO, E.H. & ARAÚJO, F.G. Serum Neuraminidase activity and haematological alterations in acute human Chagas'disease. **Clin. Immunol. Immunopathol.** v. 46, p. 157-61, 1988.

THEIS, J.H., TIBAYRENC, M. MASON, D.T. & AULT, S.K. Exotic stock of *Trypanosoma cruzi* capable of development in and transmission by *Triatoma protracta* from California: public health implication. **Am.J.Trop.Med.Hyg.** v. 36, p.523-8, 1987.

TRISCHANN, T.M. Role of cellular immunity in protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. **P. Immunol.** v. 6, p. 561-70, 1984.

THOMSON, L.; GADILLHA, F.R.; PELUFFO, G.; VERCESI, A.E. & RAD, R. Peroxynitrite affects Ca²⁺ transport in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Bioch. Parasitol.** v.98, p.81-94, 1999.

TUFFERY, A. A. Laboratory Animals: An Introduction for New Experimenters. Editora A. Wiley – Interscience publication, p. 171 – 177. 1987.

UMEZAWA, E.S., MILDER, R. & ABRAHAMSOHN, I.A. *Trypanosoma cruzi* amastigotes development *in vitro* and infectivity *in vivo* of the forms isolated from spleen and liver. **Acta Trop.** v. 42, p. 25-32, 1985.

UYEMURA, S.A.; ALBUQUERQUE, S. & CURTI, C. Energetics of Heart Mitochondria during Acute Phase of *Trypanosoma cruzi* Infection in Rats. **Int.J.Biochem.Cell Biol.**, v.27, n.11, p.1183-9, 1995.

VALE, W.; SPIESS, J.C. & RIVIER, J. Characterization of 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates the secretion of corticotropin and beta endorphin. **Science**. v. 213, p. 1394-97, 1981.

VICHI, F.L. Avaliação quantitativa do parasitismo de coração, vasos da base e coronária do rato na fase aguda da moléstia de Chagas. **Rev.Inst.Med.Trop.** v.6, p.292-296, 1964.

WEIGENT, D. A., & BLALOCK, J. E. Association between the neuroendocrine and immune system, **J.Leukocyte.Biol.** v. 58, p.137, 1995.

WING, S.S. & GOLDBERG, A.L. Glicocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. **Am Physiol Soc.** p. 668-76, 1993.

WHO. Chagas' Disease, Chile. In. Weekly epidemiological record, v.75, n.2 . p.9-16, 2000.

ZAIDENBERG, M.; SEGOVIA, A. Enfermid de Chagas congênita em la ciudad de Salta, Argentina. **Ver.Inst.Med.Trop.** SP, v.35, n.1, p.35-43, 1993.

ZHOU, D.; KUSNECOV, A.W.; SHURIN, M.R.; DE PAOLI, M. & RABIN, B. Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin-6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Endocrinology**. v.133, p.2523, 1993.

